

**Einfluß des Gewebszerfalls
auf die Nachweisbarkeit von Viren;
speziell experimentiert am Influenzavirus
und am Mäuselungengewebe**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

1964

vorgelegt von

HORST TIMM

aus Berlin

Dekan: Professor Dr. med. Adalbert Loeschke
Referent: Professor Dr. med. Georg Henneberg
Korreferent: Professor Dr. med. Bernhard Schmidt

Gliederung

Einleitung	307
1. Schwierigkeit der Virusisolierung aus zerfallendem Gewebe (Sektionsmaterial)	
2. Kasuistik	
Schrifttum (siehe Zbl. Bakt. I Ref. 199, 1 [1965])	
1. Die Virusvermehrung in der Mäuselunge	
2. Der Gewebszerfall	
3. Der Einfluß von Gewebszerfall, physikalischen, chemischen und anderen Faktoren auf die Haltbarkeit von Viren im allgemeinen und von Influenzaviren im besonderen	
Eigene Untersuchungen	308
Material und Methodik	308
1. Vorversuch:	
Der Einfluß der Aufarbeitungstemperatur auf Virusadsorption und -elution	
2. Hauptversuche	
Versuchsreihe I:	310
Die Haltbarkeit von Influenzavirus in zerfallendem Mäuselungengewebe in Abhängigkeit von den Faktoren Zeit, Temperatur, Bakterienzusatz und Wasserstoffionenkonzentration	
Versuchsreihe II:	314
Die Beeinflussung des Hämagglutinins und der Infektiosität von PR8-Virus durch Staphylokokken, Streptokokken, Bacterium proteus und Pseudomonas aeruginosa	
Versuchsreihe III:	317
Der Einfluß des Infektionsalters auf die Virusnachweisbarkeit	
Versuchsreihe IV:	321
a) Die Haltbarkeit von Influenzavirus in natürlich infizierten Lungen und in solchen, denen das Virus künstlich zugesetzt wurde.	
b) Die Haltbarkeit von Influenzavirus in der Lungensuspension und im erhaltenen Gewebsverband	
Versuchsreihe V:	322
Das Verhalten von Influenzavirus in isotonischen Phosphatpufferlösungen bekannter Wasserstoffionenkonzentration, denen verschieden vorbehandelte Lungengewebsextrakte zugesetzt wurden	
Versuchsreihe VI:	324
Ergänzende Beobachtungen, die während der Arbeiten an Versuchsreihe V gemacht wurden	
Besprechung der Ergebnisse	326
Zusammenfassung.	333
Literaturverzeichnis (siehe Zbl. Bakt. I Ref. 199, 1 [1965])	

Für die Themenstellung und die Beratung bei der Bearbeitung bin ich
Herrn Prof. Dr. Georg Henneberg, Direktor des Robert Koch-Institutes Berlin
zu größtem Dank verpflichtet.



Aus dem Robert Koch-Institut, Berlin
(Direktor: Prof. Dr. GEORG HENNEBERG)

Einfluß des Gewebszerfalls auf die Nachweisbarkeit von Viren; speziell experimentiert am Influenzavirus und am Mäuselungengewebe¹

Horst Timm

Eingegangen am 17. Dezember 1964

Die Grundlage für das Arbeitsthema bildeten praktische Erfahrungen des virologischen Untersuchungslaboratoriums des Robert Koch-Institutes. Es kann immer wieder beobachtet werden, daß trotz eines vorliegenden klinischen und pathologisch-anatomischen Verdachts auf eine Influenzaerkrankung aus dem Sektionsmaterial kein Influenza-Virus isolierbar ist. Dabei muß berücksichtigt werden, daß gerade das Krankheitsbild der Grippe außerhalb von Epidemiezeiten klinisch schwer zu erkennen ist und ein weites Feld differentialdiagnostischer Überlegungen bietet. Damit muß man an die Möglichkeit denken, daß in bestimmten Fällen eine Virusisolierung von vornherein unmöglich ist. Aber dennoch liegt die Vermutung nahe, daß z. B. auch Einflüsse wie Gewebszerfall, p_H -Verschiebungen, bakterielle Verunreinigungen, eine Virusnachweisbarkeit beeinflussen oder gar ganz verhindern können. Die folgenden beiden Fälle, die uns in dieser Hinsicht besonders eindrucksvoll erscheinen, mögen die vorliegende Problematik beleuchten.

Fall 1: S. Nr. 201/60

Die 58jährige Patientin M. E. wurde zur Vornahme einer Colon-Carcinom-Resektion stationär aufgenommen. Nach der Operation stellten sich unter Temperaturanstieg die Zeichen einer Lungenentzündung ein. Klinisch wurde an eine Grippepneumonie gedacht. Am 6. Tage post operationem (17. Februar 1960) verstarb die Patientin mit den Zeichen eines toxischen Kreislaufzusammenbruchs. Pathologisch-anatomisch wurden eine atypische fibrinreiche Pseudolobärpneumonie beider Lungenunterlappen und eine schwere katarhalisch-eitrige Tracheobroncho-Bronchiolitis als Todesursache festgestellt. Bakteriologisch wurden im Lungen- und Trachealabstrich folgende Keime gefunden: *E. coli*, *Staphylococcus aureus haemolyticus* und Enterokokken. Bereits 2 1/2 Std. nach dem Tode der Patientin wurde ein Lungengewebsstück zur virologischen Untersuchung eingeschickt. Auch nach 5 Amnionpassagen in bebrüteten Hühnereiern konnte kein Influenzavirus isoliert werden.

Fall 2: S. Nr. 202/60

Der 59jährige Patient H. G. wurde am 3. Februar 1960 wegen eines Myocardinfarktes stationär aufgenommen. Am 14. Februar 1960 kam es ganz akut zum Auftreten einer

¹ Inaugural-Dissertation (Die Diskussion über das Schrifttum wurde getrennt im Zbl. Bakt. I. Ref. **199**, 1 (1965) veröffentlicht.)

diffusen Pneumonie mit Beteiligung beider Lungenunterlappen und des rechten Oberlappens, die trotz der Nutzung aller therapeutischen Maßnahmen nicht beherrscht werden konnte. Klinisch wurde eine Grippepneumonie vermutet. Auch pathologisch-anatomisch wurde diese Diagnose als Todesursache bestätigt. Es fanden sich eine ausgedehnte beiderseitige hämorrhagische und eitrige Pneumonie, eine schwere pseudomembranöse Tracheobronchitis und eine serofibrinöse gering hämorrhagische Pleuritis. Im Lungen- und Trachealabstrich fand sich eine Reinkultur von *Staphylococcus aureus haemolyticus*. 11 1/2 Std. nach dem Tode wurde das Lungengewebe für die virologische Untersuchung entnommen. Auch in diesem Falle konnte trotz mehrerer Versuchsansätze (5 Amnionpassagen) kein Virus isoliert werden.

Eigene Untersuchungen

Material und Methodik

Virus

Die Versuche wurden mit Influenzavirus A/PR 8 durchgeführt. Da dieser Stamm relativ haltbar ist, schien er für die geplanten Experimente besonders geeignet zu sein. Für die Infektion der Versuchstiere wurde eine Mäuselungensuspension verwendet. Infizierte Lungen wurden im offenen Mörtel zermahlen und das Virus durch Zusatz von gepufferter physiologischer Kochsalzlösung (im Verhältnis 1:10) extrahiert. Durch kurzes Zentrifugieren wurden Sand und Zelltrümmer zum Absetzen gebracht und die überstehende virus-haltige Flüssigkeit nach Anlegen von Sterilitätskontrollen in Ampullen abgefüllt und im Kältetresor bei -70°C aufbewahrt. In anderen Fällen wurde mit PR 8-haltiger Allantoisflüssigkeit infiziert.

Reinigung des Virus

Rote Hammel-Blutkörperchen wurden dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und dem zu reinigenden Material in solcher Menge zugegeben, daß eine 5%ige Erythrocytensuspension entstand. Bindung in einem Eiswasserbad $2-3^{\circ}\text{C}$. Nach scharfem Zentrifugieren, bei dem jede Erwärmung vermieden werden mußte, wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert, verworfen und durch eine gleiche Menge eines neuen, auf 37°C erwärmten Mediums, das das gereinigte Virus aufnehmen sollte, ersetzt. Diese Suspension wurde eine Std. bei 37°C aufbewahrt. Nach erneutem Zentrifugieren enthielt der Überstand das gereinigte Virus. Eine Prüfung des Hämagglutinationstiters ergab einen quantitativen Einblick in den Erfolg der Reinigung.

Versuchstiere und ihre Infektion

Für die Versuche wurden weiße Swiss-Mäuse mit einem durchschnittlichen Gewicht von 20–22 g verwendet. Zur Infektion diente die oben beschriebene Lungensuspension. Nach vorsichtigem Auftauen wurde der Ampulleninhalt mit gepufferter physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1:10 (1 Teil Suspension + 9 Teile Kochsalzlösung) verdünnt, so daß eine 10^{-2} Suspension vorlag. Diese wurde unter gleichbleibendem Sauerstoffdruck mit Hilfe eines Aerosolgerätes zerstäubt. Um eine möglichst einheitliche Infektion aller Versuchstiere zu erreichen, wurden diese in Gruppen von jeweils 30 bis 40 Stück dem virus-haltigen Nebel stets 2 Min. lang ausgesetzt. In der Regel wurden die Tiere 48 Std. nach der Infektion mit Äther getötet. Ihre Felle wurden durch Eintauchen in Lysollösung desinfiziert. Unter häufigem Wechsel der Instrumente wurden die Lungen unter aseptischen Bedingungen gewonnen. Sie wurden in sterilen Versandgefäßen aufbewahrt und den verschiedensten Versuchsbedingungen ausgesetzt.

Virusnachweis

Der Virusnachweis wurde durch die Titration des Hämagglutinins, hauptsächlich aber durch die vorhandene Infektiosität für Hühnerembryonen geführt.

a) Titration des Hämagglutinins

Die Titration des Hämagglutinins wurde wie üblich mit einer 0,5% igen, jeweils frisch hergestellten Hühnererythrocytensuspension ausgeführt. Nach 1 Std. bei Zimmertemperatur wurden die Ergebnisse abgelesen. Die angegebenen Titer beziehen sich stets auf die Endverdünnung (Verdünnung einschließlich Erythrocytenzusatz) und stellen – soweit nicht anders vermerkt – ++++ -Werte dar. Die Titrationen wurden jeweils in 3 Reihen ausgeführt.

b) Nachweis der Virusinfektiosität

Das Influenzavirus wurde den verschiedensten Versuchsbedingungen ausgesetzt. Der Nachweis seiner erhaltenen oder erloschenen Infektiosität wurde qualitativ im Infektionstest am 11 Tage lang vorbebrüteten Hühnerei geführt (weiße Leghorn). Das zu verimpfende Material wurde mit Antibiotica versetzt, deren Art und Menge von der vorhandenen Resistenzbestimmung abhing. Lag eine solche nicht vor, wurden routinemäßig 500 E Penicillin und 500 γ Streptomycin je ml des zu verimpfenden Materials zugesetzt. Zur Hemmung von Proteuskeimen wurden den Mäuselungenaufschwemmungen meist noch 10 γ Neomycin je ml hinzugefügt. Eine Einwirkungszeit von einer Std. bei Zimmertemperatur reichte aus, die Keime abzutöten. Anschließend wurde das zu verimpfende Material 5 Min. lang bei 3000 Umdrehungen pro Min. zentrifugiert, damit sich die abgestorbenen Bakterienleiber sedimentierten. Nach Anlegen von Sterilitätskontrollen wurde der Überstand in sterile Injektionsspritzen aufgezogen. Nach Desinfektion der äußeren Schale des Eies mit Jod-Alkohol wurden stets 0,2 ml der entsprechenden Probe in die Allantoishöhle injiziert. Jede zu verimpfende Probe wurde jeweils auf 5 Eier übertragen. Diese wurden 48 Std. bei 37°C bebrütet. Während dieser Zeit wurde mehrmals durchleuchtet. Eventuell abgestorbene Eier wurden ausgesondert. Nach Abschluß der Bebrütung wurden die Embryonen über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Der Nachweis der erfolgten oder ausgebliebenen Virusvermehrung wurde durch die Hämagglutination im Röhrchentest in einer Allantoisverdünnung von 1:20 geführt.

In einigen Fällen wurde mit Hilfe des Eiinfektionstestes die ID₅₀ für Hühnerembryonen ermittelt. Die Berechnungen erfolgten nach REED und MUENCH (58).

Die Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration

Für die Messungen standen die Geräte Pehamat und das pH-Meter E 150 A der Metrohm AG zur Verfügung. Mit Hilfe einer Ingold-Einstabmeßkette Typ 206/304 war es möglich, auch im Lungengewebe die Wasserstoffionenkonzentration zu ermitteln. Die angegebenen Meßwerte für das Lungengewebe wurden nach mehreren Proben an verschiedenen Stellen des Gewebestückes und in verschiedener Tiefe als Mittelwerte errechnet. Um ein Verschleppen von Virus bei dieser Untersuchung zu vermeiden, mußte die Sonde nach jeder Messung gründlich desinfiziert werden (chemische Vorreinigung mit in Propylalkohol (70%ig) getränkter Watte, längere Zeit mit Prophylalkohol und anschließend mit Aqua dest. gespült). Nach jeder Reinigung wurde das Gerät erneut geeicht.

1. Vorversuch

Da das Grippevirus eine besondere Affinität zu den Epithelzellen der Schleimhaut des Respirationstraktes und zu den Oberflächen der Erythrocyten hat, besteht die Gefahr, daß Viren an Zellelemente des zernörsterten Lungengewebes gebunden sind. Während der Zeit der Einwirkung der Antibiotika bei Zimmertemperatur hat dann das Virus außerdem ausreichend Gelegenheit, sich an die Oberflächen erhalten gebliebener Respirationsepithelien, Erythrocyten und Erythrocytenmembranen zu heften. Da die Suspensionen nun vor dem Verimpfen zentrifugiert werden und nur der Überstand verimpft wird, muß angenommen werden, daß sich ein Teil der Viren im Bodensatz befindet und so dem Nachweis entzogen wird. Damit erhebt sich nun die Frage, ob das Influenzavirus durch eine Elution bei 37°C diesen Adsorptionsvorgängen entzogen werden kann. Besonders bei Untersuchungsmaterialien, die von vornherein einen nur geringen Virusgehalt haben, würde sich eine solche Adsorption nachteilig auswirken.

Versuchsanordnung

10 Mäuse wurden in der oben beschriebenen Weise mit PR 8-Virus infiziert, 48 Std. nach der Infektion getötet und ihre Lungen entnommen, das Gewebe bei -70°C aufbewahrt. Am Versuchstage wurde es schonend aufgetaut, gewogen und mit sterilem Seesand zermahlen. Die Zelltrümmer wurden in gepufferter physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1:10 suspendiert. Nach Antibioticazusatz wurde sofort der Hämagglutinationstiter bestimmt. Dann wurde die Suspension 3 Std. lang in einem Eiswasserbad bei 2°C aufbewahrt. Danach wurde die Suspension unter ständiger Kühlung 5 Min. bei 3000 Umdrehungen pro Min. zentrifugiert. Von einer Probe des Überstandes wurden der Hämagglutinationstiter und die ID₅₀ für 11 Tage alte Hühnerembryonen bestimmt. Durch Anlegen zweier Verdünnungsreihen mit dem Verdünnungsfaktor 10 (jedes Röhrchen ent-

hielt 10% des Ausgangsmaterials des vorhergehenden) wurde versucht, eine größere Genauigkeit bei der Bestimmung der ID_{50} zu erhalten. Als Ausgangswerte für diese Reihen dienten Verdünnungen von 1:10 bzw. 1:50. Das Material wurde auf jeweils 5 Eier verimpft. Im Anschluß daran wurde das Sediment durch kurzes Umrühren resuspendiert und in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt und 45 Min. bei dieser Temperatur belassen, danach sofort warm zentrifugiert und vom Überstand erneut Hämagglutinationstiter und ID_{50} wie oben beschrieben bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 1 zusammengestellt. Sie zeigen, daß der Hämagglutinationstiter nach dem Erwärmen auf 37°C auf 1:1280 angestiegen ist, während er nach dem Eiswasserbad nur bei 1:80 liegt. Dagegen ist der Infektiositätstiter der Lungenaufschwemmung nach Abkühlung und anschließender Erwärmung unverändert geblieben.

Während dieses Versuches konnte nebenher noch folgende interessante Beobachtung gemacht werden. Vor dem Einfrieren des Versuchsmaterials bei einer Temperatur von -70°C war von einigen Lungen dieser Versuchstiergruppe die ID_{50} bestimmt worden. Sie lag bei 10^{-9} . Nach einer Zeit von 204 Tagen bei dieser Aufbewahrungstemperatur wurden die Lungen verwendet. Die ID_{50} war nach diesem Intervall auf $10^{-8,25}$ abgefallen.

Tabelle 1

Verhalten von HA-Titer und Infektiosität einer PR 8-haltigen Mäuselungenaufschwemmung nach Abkühlung auf 2°C und anschließender Erwärmung auf 37°C

	Hämagglutinationstiter	ID_{50}
Unmittelbar nach dem Zermörsern	1:160	nicht bestimmt
nach 3 Std. Eiswasserbad	1:80	$10^{-8,25}$
nach Elution bei 37°C (45 Min.)	1:1280	$10^{-8,25}$

2. Hauptversuche

Versuchsreihe I

Die Haltbarkeit der Viren im zerfallenden Gewebe kann durch eine Vielzahl von Einflüssen beeinträchtigt werden. Dabei stehen besonders zwei Faktoren im Vordergrund: Die Aufbewahrungstemperatur und die Aufbewahrungsdauer. Temperaturen unter dem Gefrierpunkt werden in der Regel von Viren gut vertragen und erweisen sich für die Aufbewahrung als besonders geeignet. Im zerfallenden Gewebe bringen höhere Temperaturen noch weitere Gefahren mit sich. Mit steigenden Temperaturen nehmen die fermentativen Abbauvorgänge bis zu einem gewissen Grade an Intensität zu. Ob und wie die Viren von der höheren Temperatur dabei beeinflußt werden, bleibt unklar. Sicher ist, daß es zur Anhäufung von Zerfalls- und Abbauprodukten des Gewebes kommt, die die Wasserstoffionenkonzentration verändern, wodurch wiederum das Virus selbst geschädigt werden kann. Da die Lungen bei Influenza, durch Sekundärinfektion bedingt, zusätzlich meist auch noch recht bakterienhaltig sind, werden sich diese Begleitkeime bei höheren Temperaturen stark vermehren können und die reine Autolyse des Gewebes in einen intensiven Fäulnisprozeß verwandeln. Die eben geschilderten Faktoren müssen sich um so nachhaltiger auswirken, je länger das Virus diesen Einflüssen ausgesetzt ist. Es war daher die Haltbarkeit von Influenzavirus im zerfallenden Lungengewebe in Abhängigkeit von Temperatur und Zeit unter besonderer Berücksichtigung der Begleitbakterien und der sich verändernden Wasserstoffionenkonzentration zu untersuchen.

Natürlich infizierte Lungen wurden 48 Stunden nach der Infektion gewonnen und in Gruppen zu je 3 Stück in sterilen Versandgefäßen aufbewahrt. Mikroskopisch zeigten sie keine pathologischen Veränderungen.

Mäusen wurde unter Äthernarkose 3 Tropfen einer Staphylokokken- bzw. Streptokokkenaufschwemmung (haemolytische Streptokokken der Gruppe A) in physiologischer Kochsalzlösung mit einer Kapillarpipette in die Nase eingeträufelt. Die bakteriologische Kontrolle der Lungen und Trachealabstriche 24 Std. nach dieser Bakterienbeimpfung zeigte, daß an Stelle des erwarteten Staphylokokken- und Streptokokkengehaltes überwiegend Proteus- und Colibakterien wuchsen.

Aus diesem Grunde wurde die Versuchsanordnung modifiziert: An Stelle der intravitalen Bakterieninokulation wurde ein Teil der Lungen mit einer 24 Std. alten Bouillonkultur von Staphylokokken bzw. Streptokokken versetzt. Es wurden je 3 Lungen mit 0,5 ml der entsprechenden Kulturflüssigkeit überschichtet. Das Material wurde bei Brutschranktemperatur (37°C), bei Zimmertemperatur (22–23°C), bei 9°C und in der Tiefkühltruhe bei –20°C aufbewahrt. Bei den für die Kühltruhe vorgesehenen Lungen wurde auf einen Bakterienzusatz verzichtet. In bestimmten Zeitabständen wurde das Gewebe zunächst bakteriologisch, dann auf seinen Virusgehalt qualitativ im Ei-Infektionstest untersucht. Da sich *Bacterium proteus* oftmals störend auswirkte, wurde auch ein Selenitnährboden verwendet, der das Schwarm-Wachstum einschränkte. Es wurden Ausstrichpräparate nach Gram gefärbt. Wenn nötig, wurden die Keime in der bunten Reihe identifiziert. Der pH-Wert wurde bestimmt. Dann wurden die Lungen zermahlen, im Verhältnis 1:5 in gepufferter physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und mit Antibiotica versetzt. Nach einer Std. Aufbewahrung bei Zimmertemperatur wurde die Aufschwemmung zentrifugiert und der Überstand auf Eier verimpft.

Der Virusgehalt in Lungen 48 Stunden nach der Infektion (ID_{50} für 11 Tage alte Hühnerembryonen) betrug $10^{-9,3}$. Der pH-Wert von gesunden Lungen - 5 Tieren kurz nach der Tötung mit Äther entnommen - lag zwischen 6,2 und 6,3.

Besonders diejenigen Ansätze, denen Bakterienbouillonkultur zugesetzt worden war und die bei 37°C aufbewahrt wurden, zeigten Zeichen einer starken Fäulnis, 17 Stunden nach Versuchsbeginn war ein stark fauliger Geruch wahrnehmbar. Das Gewebe war schaumig aufgetrieben und nach weiteren 24 Stunden z. T. in Zerfall, z. T. in Auflösung begriffen. Diese Prozesse liefen bei Zimmertemperatur wesentlich langsamer ab. Hier wurde das Stadium der schaumigen Gewebeauftreibung und des beginnenden Zerfalls erst frühestens nach 4–5 Tagen beobachtet. Bei den bei +9°C aufbewahrten Lungen wurden diese makroskopischen Veränderungen des Gewebszerfalls in einem derartigen Ausmaß überhaupt nicht beobachtet.

Sehr schwierig gestaltete sich vor allem der Nachweis der Streptokokken. Meist wurden sie von Proteuskeimen überwuchert, so daß sie nicht isoliert werden konnten. In vielen Fällen konnte die Diagnose nur durch die von den Lungenabstrichen angefertigten Grampräparate gestellt werden, dadurch konnte nicht mit Sicherheit ausgesagt werden, ob die Streptokokken noch vermehrungsfähig waren.

Die Ergebnisse des Versuchsablaufes sind in den Tabellen 2–4 zusammengefaßt:

Virus in den Lungen, im Brutschrank aufbewahrt, verliert seine Infektiosität für Hühnerembryonen am 4. Tag nach Versuchsbeginn. Ein Unterschied zwischen den Versuchsansätzen mit und ohne Bakterienzusatz besteht nicht.

Bei 22–23°C aufbewahrt, ist das Virus aus dem Gewebe mit einem Streptokokkenzusatz bis zum 14. Tag nach Versuchsbeginn nachweisbar. In den

Ansätzen, mit Staphylokokken oder ohne Bakterien, ist das Virus bis zum 19. bzw. 21. Tage nach Versuchsbeginn im Infektionstest nachweisbar.

Bei einer Aufbewahrungstemperatur von 9°C ist das Virus in den Lungen ohne Bakterienzusatz bis zum 42. Tag, im Gewebe mit Streptokokkenzusatz bis zum 56. Tag und in dem mit Staphylokokkenzusatz in beschränktem Umfang bis zum 76. Tag (eine Allantoisflüssigkeit hämagglutinierte eindeutig und spezifisch + + + +!) vermehrungsfähig.

Tabelle 2

Einfluß von Temperatur, pH-Wert und Bakterienwachstum auf die Nachweisbarkeit¹ von Influenzavirus (PR 8) in natürlich infizierten Mäuselungen, die 48 Std. nach der Infektion gewonnen wurden

Natürlich infizierte Mäuselungen ohne Bakterienzusatz				Zusatz von Staph. aureus haemolyticus			Zusatz von haemolyt. Streptokokken (Gr.A)		
Tage nach Versuchs- beginn	pH	Bakteriolog. Befund	Eiinfekt. test	pH	Bakteriolog. Befund	Eiinfekt. test	pH	Bakteriolog. Befund	Eiinfekt. test
Versuchs- beginn 16 ⁰⁰	6,2	Ø	5/5	6,5	Staph.	5/5	6,1	Strept.	5/5
1	6,1	Bact. prot.	5/5	6,2	Staph.	5/5	5,8	Strept.	5/5
	6,1	Bact. prot.	5/5	6,5	Staph. u. Bact. prot.	4/4	6,6	Strept. u. Bact. prot.	5/5
2	6,0	Bact. prot.	3/5	8,4	Staph., Prot. gramneg. Diplokokken	2/5	8,1	Strept. u. Bact. prot.	5/5
	7,3	Bact. prot.	4/5	6,8	Staph. u. Bact. prot.	4/4	7,2	Strept. u. Bact. prot.	4/4
3	7,3	Bact. prot.	1/4	7,9	Staph. u. Bact. prot.	2/5	7,5	Strept. u. Bact. prot.	4/5
	7,2	Bact. prot.	5/5	7,8	Staph. u. Bact. prot.	3/3	7,8	Bact. prot.	1/5
4	6,7	Bact. prot.	0/4	7,7	Staph. u. Bact. prot.	0/4	7,9	Bact. prot. u. Strept. (?)	0/4
5	6,9	Bact. prot.	0/5	7,6	Staph., gram- neg. Stäbch., vereinzelt Sporenbildner	0/5	7,3	Bact. prot. u. Strept. (?)	0/5
6	6,6	Bact. prot., Staph. u. grampos. Stäbchen	2/4	7,8	Bact. prot. u. Staph.	(1)/5	8,0	Bact. prot., Sporenbildn. Staph. od. Strept. (?)	(2)/5
7	6,6	Bact. coli	0/5	7,8	Staph. u. Farbstoff- bildner	0/5	7,8	Bact. prot. u. Strept.	0/5

Die Aufbewahrungstemperatur des Untersuchungsmaterials lag bei 37°C. Die bakteriolog. Untersuchung erfolgte durch Lungenabstrich. Entnahmezeit der Proben: 9⁰⁰. Wurde an einem Tag eine zweite Untersuchung durchgeführt, so wurden die Proben zusätzlich um 14⁰⁰ entnommen.

¹ Der Virusnachweis wurde durch den Ei-Infektionstest geführt. Die Ergebnisse wurden in Form eines Bruches dargestellt. Der Nenner gibt die Zahl der beurteilten Eier (= lebenden Embryonen) an, die in der Regel 5 beträgt. Er wird kleiner als 5, wenn abgestorbene Embryonen ausgesondert wurden. Der Zähler gibt die Zahl der Eier an, in denen eine Virusvermehrung stattgefunden hat.

Da in der letztgenannten Versuchsgruppe zwischen den einzelnen Proben größere Abstände liegen, geben die Zeitangaben nur eine Übersicht über die durchschnittliche Haltbarkeit wieder.

Eine Aussage über die Beeinflussung der Virusnachweisbarkeit durch die künstlich zugesetzten Bakterienkulturen ist bei den vorliegenden Ergebnissen nur begrenzt möglich. Dagegen ist eine Beziehung zwischen Wasserstoffionenkonzentration und erhalten gebliebener oder verlorengegangener Infektiosität recht gut zu erkennen. Als besonders eindrucksvolles Beispiel sei das Ergebnis der Tabelle 3 (Virusinfizierte Lungen ohne Bakterienzusatz) aufgeführt. Die am 10., 11. und 14. Tag entnommenen Proben haben einen

Tabelle 3

Aufbewahrungstemperatur des Untersuchungsmaterials: 22–23° C. Entnahmezeit der Proben: 9⁰⁰.

Natürlich infizierte Mäuselungen ohne Bakterienzusatz				Zusatz von Staph. aureus haemolyticus			Zusatz von haemolyt. Streptokokken (Gr.A)		
Tage nach Versuchs- beginn	pH	Bakteriolog. Befund	Eiinfekt. test	pH	Bakteriolog. Befund	Eiinfekt. test	pH	Bakteriolog. Befund	Eiinfekt. test
Vers. Beginn 6,2 16 ⁰⁰		Ø	5/5	6,5	Staph.	5/5	6,1	Strept.	5/5
1	6,1	Bact. prot.	5/5	5,8	Staph.	4/4	5,9	Strept.	5/5
3	6,0	Ø	2/3	7,3	Staph. u. Bact. prot.	5/5	6,6	Strept. u. Bact. prot.	4/4
5	5,6	Bact. prot. u. Staph.	4/5	6,1	Staph. u. Bact. prot.	5/5	6,6	Bact. prot. u. Strept. (?)	5/5
6	7,9	Staph. Keime d. Pseudomonasgruppe	5/5	6,9	Staph.	5/5	7,1	Bact. prot. u. Strept. (?)	2/3
7	6,2	Bact. coli	5/5	7,5	Staph. u. Bact. prot.	4/4	6,3	Bact. prot. u. Strept. (?)	4(5)/5
8	7,0	Strept. u. gramneg. Stäbchen	5/5	6,8	Staph. u. Bact. prot.	3/3	7,1	Bact. prot. u. Strept. (?)	2(3)/5
9	6,6	Bact. prot. u. Strept.	5/5	6,7	Staph., Bact. prot. u. gram- pos. Stäbchen	4/5	6,7	Bact. prot. u. Strept.	5/5
10	7,3	Bact. prot. u. Strept.	0/5	6,8	Staph. u. Bact. prot.	5/5	6,5	Bact. prot. u. Strept. (?)	5/5
11	8,1	Bact. prot.	0/5	6,5	Staph. u. Bact. prot.	4/4	6,6	Bact. prot. u. Strept. (?)	4/4
14	8,4	Bact. prot. u. Strept.	0/4	8,3	Staph.	3/5	6,5	Bact. prot. u. Strept.	4/4
16	6,7	Bact. prot. Strept., Sarcine	4/4	6,8	Staph. u. Bact. coli	4/4	8,3	Bact. prot. Strept., gram- pos. Stäb.	0/5
19	6,3	Sarcine	5/5	6,8	Staph. u. Bact. prot.	3/4	7,1	Bact. prot., Strept. od. Sarcine (?)	0/5
21	6,7	Sarcine	5/5	7,8	Staph. u. Bact. prot.	0/5	7,2	Bact. prot. Strept. (?)	0/5
28	8,4	Sarcine	0/4	6,6	Staph. u. Bact. prot.	0/4	6,7	Bact. prot. Strept. (?)	0/5
34	7,8	Bact. prot. u. Sarcine	0/5	6,5	Staph. u. Bact. prot.	0/5	7,2	Bact. prot. Strept.	0/5

pH-Wert von 7,3, 8,1 und 8,4. In allen 3 Fällen ist das Virus nicht mehr nachgewiesen worden. Die am darauffolgenden 16., 19. bzw. 21. Versuchstag untersuchten Gewebe haben dagegen wieder einen schwach sauren pH-Wert. Das Virus konnte aus ihnen isoliert werden. Ein ähnliches Verhalten ist auch in den übrigen Tabellen erkennbar.

Bei einer Aufbewahrungstemperatur von -20°C zeigen die am 143. und 200. Tag nach Versuchsbeginn entnommenen Proben bei den Sterilitätskontrollen kein Bakterienwachstum. Die Wasserstoffionenkonzentration des Gewebes liegt bei 6,4 bzw. 6,2. In beiden Fällen ist das Virus für alle Eier infektiös. Da das Virus über den 200. Tag hinaus vermehrungsfähig blieb, wurden die Ergebnisse dieser letzten Versuchsgruppe nicht besonders tabellarisch erfaßt.

Tabelle 4

Aufbewahrungstemperatur des Untersuchungsmaterials: 9°C . Entnahmezeit der Proben:
9⁰⁰

Natürlich infizierte Mäuselungen ohne Bakterienzusatz				Zusatz von Staph. aureus haemolyticus			Zusatz von haemolyt. Streptokokken (Gr. A)		
Tage nach Versuchs- beginn	pH	Bakteriolog. Befund	Eiinfekt. test	pH	Bakteriolog. Befund	Eiinfekt. test	pH	Bakteriolog. Befund	Eiinfekt. test
Vers. Beginn	6,2								
16 ⁰⁰		Ø	5/5	6,5	Staph.	5/5	6,1	Strept.	5/5
3	6,0	Ø	5/5	5,9	Staph.	5/5	6,2	Strept.	5/5
6	6,2	Bact. prot.	5/5	6,5	Staph.	5/5	6,0	Strept. u.	5/5
								Bact. prot.	
14	5,9	Bact. prot. u.	5/5	5,6	Staph. u.	4/4	6,2	Strept. (?) u.	5/5
		Strept. (?)			Bact. prot.			Bact. prot.	
35	5,2	Bact. prot.	5/5	5,9	Staph.	4/4	5,9	Strept. u.	4/4
								Bact. prot.	
42	6,6	Bact. prot. u.	5/5	6,4	Staph. u.	5/5	7,2	Strept. (?) u.	5/5
		Sarcine			Bact. coli			Bact. prot.	
49	7,5	Bact. prot.	0/4	6,2	Staph. u.	5/5	5,7	Strept. (?) u.	4/5
					Bact. prot.			Bact. prot.	
56	8,1	Ø	0/5	6,7	Staph. u.	5/5	6,5	Bact. prot.	5/5
					Pseudomonas fluorescens				
76	8,3	Ø	0/5	7,8	Staph. u.	1(2)/5	7,1	Bact. prot.	0/5
					Bact. prot.				

Versuchsreihe II:

Die Ergebnisse des vorausgegangenen Versuches ließen keine klare Aussage über den Einfluß von Bakterien im Rahmen des Gewebszerfalls auf die Virusnachweisbarkeit zu. In einer abgewandelten Versuchsanordnung sollte der Einfluß der Bakterien auf das PR8-Virus gesondert untersucht werden. Neben Staph. aur. haem. und den haemolyt. Strept. der Gruppe A sollte zusätzlich der Einfluß von *Bacterium proteus* und von *Ps. aeruginosa* auf das Virus untersucht werden.

In der folgenden Versuchsanordnung sollte die Frage nach der Beeinflussung des Hämagglutinins und der Infektiosität des Virus durch die genannten Bakterien geklärt werden:

- a) Beeinflussung des Hämagglutinins von PR8-Virus durch Staphylokokken, Streptokokken, *Bacterium proteus* und *Pseudomonas aeruginosa*:

Die Allantoishöhlen 11 Tage alter Hühnerembryonen wurden mit PR8-Virus in einer Verdünnung von 10^{-4} infiziert und die Allantoisflüssigkeiten 48 Std. nach der Infektion entnommen und miteinander vermischt. Nach kurzem Zentrifugieren wurden Sterilitätskontrollen angelegt. Bis zur Weiterverwendung wurde das Material bei -20°C aufbewahrt. Am Versuchstage wurde ein Teil der virushaltigen Allantoisflüssigkeit mit einem Teil einer 24 Std. alten Brutschrankkultur der oben genannten Bakterien in Nährbouillon, die Streptokokken in Traubenzuckerbouillon, vermischt. Als Kontrollen dienten reine Allantoisflüssigkeit und eine Allantoisflüssigkeit, die mit bakterienfreier Bouillon versetzt wurde. Jeder Versuchsansatz wurde doppelt angelegt. Da die erhaltenen Werte jeweils übereinstimmten, wurden sie bei der Zusammenstellung der Versuchsergebnisse nicht besonders abgeführt. Aufbewahrungstemperatur 37°C .

In bestimmten Abständen wurden die Proben der Versuchsansätze entnommen und ihr Hämagglutinin ausgetitriert. Um unspezifische Hämagglutinationen auszuschließen, wurden bei jeder Probe die Bouillon und die reinen Bakterienkulturen in einer Verdünnung von 1:20 und 1:40 gegen die verwendete Erythrocytensuspension ausgetestet. Die Kontrollen fielen stets negativ aus. Insgesamt wurde der Versuch bis zum 12. Tag nach Versuchsbeginn ausgedehnt. Die Streptokokken waren bereits am 3. Tag nach Versuchsbeginn nicht mehr anzüchtbar.

Der Versuchsablauf zeigt deutlich, daß allein *Pseudomonas aeruginosa* einen starken Abfall des Hämagglutinationstiters hervorruft, während die übrigen Keime die Hämagglutination nur gering oder gar nicht beeinflussen. So zeigen die Streptokokken eine Beeinflussung des Virus, die in einem leichten Titerrückgang auf 1:320 zum Ausdruck kommt. Hier liegt jedoch die Wasserstoffionenkonzentration mit 6,3 im Gegensatz zu den anderen Versuchsansätzen im sauren Bereich.

Ergänzend wurde ein Versuchsansatz mit Pyocyaneuskeimen bei Zimmertemperatur in Dunkelheit und bei Tageslicht sowie bei Kühlschranktemperatur angelegt. Da unter diesen Versuchsbedingungen der Hämagglutinationstiter über einen Zeitraum von 12 Tagen unverändert blieb, wurden die Ergebnisse nicht besonders tabellarisch aufgeführt.

Um den Versuch zu machen, die Ursache des Titerabfalles, der bei 37°C durch *Pseudomonas aeruginosa* verursacht wurde, aufzuklären, wurde das Pyocyanin besonders beachtet, zumal beobachtet wurde, daß der Titer mit der einsetzenden Farbstoffbildung allmählich abfiel. Der Farbstoff ist ein Phenazinabkömmling mit gewissen bakteriziden Eigenschaften. Es wurde versucht, den Farbstoff in den Kulturen besonders anzureichern. Mit Hilfe eines Membranfilters wurde das bakterienfreie Kulturfiltrat gewonnen und der virushaltigen Allantoisflüssigkeit – wie oben beschrieben – zugesetzt. Aufbewahrungstemperatur 37°C . Bis zum 12. Tage nach Versuchsbeginn konnte eine Beeinflussung des Virushämagglutinins nicht beobachtet werden.

- b) Beeinflussung der Infektiosität von PR8-Virus durch Staphylokokken, Streptokokken, *Bacterium proteus* und *Pseudomonas aeruginosa*.

PR8-haltige Allantoisflüssigkeit diente als infektiöses Ausgangsmaterial, das – wie unter a) beschrieben – mit den genannten Bakterienbouillonkulturen im Verhältnis 1:1 gemischt, im Brutschrank bei 37°C aufbewahrt wurde. Als Kontrollansatz diente Allantoisflüssigkeit, die mit steriler Bouillon gemischt wurde. Wegen der antibiotischen Eigenschaften des Pyocyanins

Tabelle 5

Beeinflussung des Hämagglutinins von PR 8-Virus durch *Bact. proteus*, *Staphylococcus aureus haemolyticus*, haemolytische Streptokokken der Gruppe A und *Pseudomonas aeruginosa*. Die angegebenen Zahlenwerte stellen den reziproken Hämagglutinationstiter dar.
Aufbewahrungstemperatur: 37°C

	pH-Wert bei Versuchs- beginn	Versuchsbeg.	1. Tag n. V.	3. Tag n. V.	5. Tag n. V.	7. Tag n. V.	10. Tag n. V.	12. Tag n. V.	pH-Wert bei Versuchs- abschluß
PR 8-Virus + <i>Bact. proteus</i>	7,7	640	640	1280	1280	1280	1280	640	8,4
PR 8-Virus + <i>Staph. aur. haem.</i>	7,2	640	640	1280	1280	640	1280	640	8,0
PR 8-Virus + Streptokokken	7,3	640	640	1280	1280	640	640	320	6,3
PR 8-Virus + <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	7,6	640	640	320	80	40	20	<20	8,5
PR 8-Virus + Bouillon	8,1	640	1280	1280	1280	1280	640	640	7,7
PR 8-Virus	8,0	1280	1280	2560	2560	1280	1280	1280	7,9

wurde zusätzlich der Einfluß eines bakterienfreien Filtrates einer 7 Tage bei 37°C aufbewahrten Bouillonkultur von *Pseudomonas aeruginosa* auf die Infektiosität des Virus untersucht. 12 Tage lang wurde den Versuchsansätzen täglich eine kleine Probe entnommen. Nach Bestimmung des pH-Wertes und nach Antibiotikazusatz, der nach Maßgabe der unten angegebenen Resistenzbestimmung erfolgte, wurde das Material 1 Stunde lang bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Nach kurzem Zentrifugieren wurden mit jeder Probe jeweils 5 Hühnereier infiziert. Außerdem wurden Sterilitätskontrollen angelegt.

Vor Versuchsbeginn wurde eine quantitative Resistenzbestimmung der verwendeten Keime im Plattentest vorgenommen. Sie ergab folgende Werte:

1. Staphylokokken: Penicillin: hochempfindlich bei 0,05 E/ml
Streptomycin: empfindlich bei 0,5 γ /ml
2. Streptokokken: Penicillin: hochempfindlich zwischen 0,01 und 0,05 E/ml
Streptomycin: mäßig empfindlich zwischen 2 und 10 γ /ml
3. *Bact. proteus*: Penicillin: über 500 E/ml resistent
Streptomycin: empfindlich zwischen 0,5 und 2 γ /ml
Neomycin: empfindlich bei 5 γ /ml
4. *Ps. aeruginosa*: empfindlich gegen Polymyxin unter 1 γ /ml

Eine Beeinflussung der Virusinfektiosität durch Neomycin und Polymyxin konnte nicht beobachtet werden. Die Streptokokken waren nach dem 3. Tag nicht mehr nachweisbar. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 6 und 7 zusammengefaßt.

Die Ergebnisse zeigen, daß das Virus im Kontrollansatz (linker Teil Tab. 6), pH-Wert 7,5, über den 12. Tag hinaus nachweisbar bleibt. Bei den Reihen, denen eine Proteus- bzw. eine Staphylokokkenkultur zugesetzt worden ist (mittlerer und rechter Teil der Tab. 6), bleibt das Virus 10 bzw. 9 Tage lang infektiös. Es wird nicht angenommen, daß eine direkte Beein-

flussung des PR8-Virus durch die genannten Keime stattgefunden hat, vielmehr ist anzunehmen, daß der Verlust der Infektiosität auf einer Anreicherung der während des Versuchsablaufes entstandenen Stoffwechselprodukte zurückzuführen ist. In beiden Fällen kommt es zu einer leichten p_H -Wertveränderung gegenüber dem Kontrollansatz. Ebenso ist eine Beeinflussung der Virusinfektiosität durch Streptokokken abzulesen. Hier ist das Virus zwar bereits am 5. Tag nach Versuchsbeginn nicht mehr nachweisbar, aber andererseits sind auch die Streptokokken unter den gegebenen Verhältnissen am 3. Versuchstag nicht mehr vermehrungsfähig. Vielmehr scheint hier die deutliche Verschiebung der Wasserstoffionenkonzentration zur sauren Seite hin eine wesentliche Rolle zu spielen. Der p_H -Wert fällt von 6,1 zu Versuchsbeginn auf 5,6 gegen Versuchsende ab.

Bei der Mischung von PR8-haltiger Allantoisflüssigkeit mit einer Kultur von *Pseudomonas aeruginosa* verschiebt sich das Milieu zur alkalischen Seite hin. Am 6. Tag nach Versuchsbeginn wird ein p_H -Wert von 8,0 erreicht. Von diesem Zeitpunkt an kann sich das Virus in der Allantoishöhle von Hühnerembryonen nicht mehr vermehren. Bei dem Versuchsansatz, der mit einem bakterienfreien Kulturfiltrat dieses Keimes angesetzt wurde, liegt der p_H -Wert konstant bei 7,9. Das Virus ist am 4. Tag nur noch für 1 Hühnerei infektiös, während es vom 5. Tage an überhaupt nicht mehr nachweisbar ist.

Tabelle 6

Einfluß von Staphylokokken, Streptokokken, *Bacterium proteus* und *Pseudomonas aeruginosa* auf den Virusnachweis durch den Infektionstest (s. a. Tab. 7)

Kontrollversuch: PR8-haltige Allantoisflüssigkeit + Bouillon (1:1)			PR8-haltige Allantoisflüssigkeit m. Staphylokokkenzusatz		PR8-haltige Allantoisflüssigkeit m. <i>Proteus</i> -zusatz	
Tage nach Versuchsbeginn	p_H	Eiinfektionstest	p_H	Eiinfektionstest	p_H	Eiinfektionstest
Versuchsbeginn	7,6	5/5	7,0	5/5	7,3	5/5
1	7,5	5/5	7,0	5/5	7,4	5/5
2	7,5	5/5	7,0	5/5	7,4	5/5
3	7,5	4/4	7,1	5/5	7,5	3/3
4	7,5	5/5	7,2	5/5	7,6	5/5
5	7,5	5/5	7,3	5/5	7,5	5/5
6	7,5	5/5	7,2	4/5	7,5	5/5
7	7,5	5/5	7,2	2/3	7,6	5/5
8	7,5	5/5	7,2	2/5	7,5	5/5
9	7,5	5/5	7,2	3/5	7,5	2/3
10	7,5	4/4	7,3	0/5	7,6	3/4
11	7,5	5/5	7,4	(1)/5	7,7	0/5
12	7,6	4/5	7,4	0/5	7,7	0/5

Tab. 6 u. Tab. 7: Aufbewahrungstemperatur 37°C

Versuchsreihe III:

Neben Aufbewahrungstemperatur und Aufbewahrungszeit, Bakterieneinfluß und Wasserstoffionenkonzentration muß ein Faktor ganz besonders

Tabelle 7

(Fortsetzung von Tabelle 6)

PR 8-haltige Allantoisflüssigkeit mit Pseudomonaszusatz			PR 8-haltige Allantoisflüssigkeit m. Zusatz eines Pseudomonas-Kulturfiltrates		PR 8-haltige Allantoisflüssigkeit m. Streptokokkenzusatz	
Tage nach Versuchsbeginn	pH	Eiinfektions-test	pH	Eiinfektions-test	pH	Eiinfektions-test
Versuchsbeginn	7,2	5/5	7,9	5/5	6,1	5/5
1	7,7	3/3	7,9	5/5	5,7	5/5
2	7,7	2/2	7,9	5/5	5,7	5/5
3	7,7	1/2	7,9	3/5	5,7	3,5
4	7,9	2/3	7,9	1/5	5,8	2/4
5	7,9	3/4	7,9	0/5	5,6	0/5
6	8,0	0/5	7,9	0/5	5,6	0/5

bei der Isolierung von Viren aus zerfallendem Gewebe beachtet werden: die Dauer der Krankheit der infizierten Tiere. So war die Frage zu klären, wie lange Influenzavirus bei unterschiedlichem Infektionsalter aus Lungengewebe als infektiöses Agens nachweisbar bleibt.

In einem Vorversuch wurden 10 Swiss-Mäuse in der oben angegebenen Weise mit PR 8-Virus infiziert und über einen Zeitraum von 5 Tagen beobachtet. In den ersten 72 Std. waren an den Tieren keine Zeichen einer Erkrankung zu bemerken. Erst am 4. Tage verstarb eine Maus. Bei den überlebenden Tieren wurden mit allmählich einsetzender Freßunlust und Bewegungsarmut die ersten Krankheitssymptome erkennbar. Am 5. Tag verstarben 4 Tiere. Die übrig gebliebenen Mäuse zeigten ein struppiges Fell, fliegende Atmung und starke Apathie. Futter und Trinkwasser wurden kaum berührt. Die Krankheit hatte wohl einen Höhepunkt erreicht. Die 5 überlebenden Tiere wurden mit Äther getötet.

Auf Grund der vorliegenden Beobachtung wurden für die Versuchsanordnung folgende Versuchsalter gewählt: Es sollte die Virusnachweisbarkeit an Lungen geführt werden, die 24, 72 und 120 Stunden nach der Infektion gewonnen wurden, d. h., zu einem Zeitpunkt kurz nach der Infektion, bei beginnenden Krankheitszeichen und auf dem Höhepunkt der Erkrankung. Diesem Ablauf entsprachen die pathologisch-anatomischen Veränderungen an den seziierten Lungen. 24 Stunden nach der Infektion zeigten sie keinerlei makroskopische Besonderheiten. 72 Stunden post infectionem waren nur ganz vereinzelt Zeichen einer hämorrhagischen Pneumonie erkennbar, während das nach 120 Stunden gewonnene Lungengewebe ausgedehnte Veränderungen aufwies, die z. T. ganze Lappen im Sinne einer roten Hepatisation erfaßt hatten. Um einen Anhalt für den Virusgehalt der Lungen während des entsprechenden Infektionsalters zu haben, wurden die ID₅₀ für die gewählten Zeiten bestimmt. Sie ergaben folgende Werte:

24 Stunden p.i.: $10^{-8,3}$
 72 Stunden p.i.: $10^{-9,6}$
 120 Stunden p.i.: $10^{-7,5}$

Der höchste Virusgehalt wurde also 72 Stunden p.i. erreicht, während die 24 und 120 Stunden-Werte wesentlich kleiner waren.

Die Lungen der überlebenden Tiere wurden in Gruppen zu je 3 in Versandgefäßen aufbewahrt. Dreimal täglich, um 8⁰⁰, 12⁰⁰ und 16⁰⁰ Uhr wurde der Inhalt eines Röhrchens auf Bakteriengehalt und Wasserstoffionenkonzentration untersucht. Die Ermittlung der vorhandenen oder erloschenen Infektiosität erfolgte dann durch den Eiinfektionstest.

Tabelle 8a

Einfluß des Infektionsalters auf die Virusnachweisbarkeit. Die Lungen wurden 24 Std. nach Infektion d. Versuchstiere gewonnen und bei 37°C aufbewahrt. Entnahmezeiten der Proben: 8⁰⁰, 12⁰⁰ und 16⁰⁰ Uhr

Tage nach Versuchsbeginn	pH	Bakteriologischer Befund	Eiinfektions- test
Versuchsbeginn 13 ⁰⁰	6,0	∅	5/5
1	5,6	Bact. proteus	5/5
	5,7	Bact. proteus	5/5
	5,1	Bact. proteus u. Strept.	5/5
2	6,0	Keime d. Pseudomonasgruppe u. Strept.	5/5
	5,7	Bact. prot. u. Staph.	5/5
	5,8	Bact. prot., Bact. coli u. Staph.	5/5
3	6,0	Bact. prot. und Strept.	5/5
	6,5	Bact. prot. und Strept.	4/4
	6,8	Bact. prot.	2/4
4	5,9	Keime der Pseudomonasgruppe u. Strept.	5/5
	6,3	Bact. prot. und Strept.	3/4
	6,1	Bact. prot. und Strept.	4/5
5	6,5	Bact. prot. und Staph.	4/4
	6,2	Bact. prot. und Staph.	5/5
	6,3	Bact. prot. und Strept.	4/4
6	6,2	Bact. prot. Staph. und grampos. Stäbchen	1/5
	6,7	Bact. prot. und Staph.	0/4
	6,1	Staph.	0/5
7	6,0	Bact. prot. und Staph.	4/4
	6,4	Bact. prot., Bact. coli und Staph.	2/5
	6,2	Bact. prot., Bact. coli und Strept.	0/5
8	7,2	Bact. prot. und Strept. (?)	0/4
	7,7	Bact. prot. und Bact. coli	0/5
	6,3	Bact. proteus	0/3

Die Tabelle 8 faßt die Ergebnisse zusammen. Daraus geht hervor, daß bei einer Aufbewahrungstemperatur von 37°C das Virus in den Lungen, die 24 Stunden nach der Infektion gewonnen wurden, am längsten haltbar war. Noch am 7. Tage nach Versuchsbeginn war es möglich, das Virus im Hühner-
ei anzuzüchten. Demgegenüber war das Virus in Lungen, die 72 bzw. 120 Stunden nach der Infektion gewonnen wurden, nur bis zum 5. Tag nach Versuchsbeginn nachweisbar.

Tabelle 8b

Einfluß des Infektionsalters auf die Virusnachweisbarkeit. Die Lungen wurden 72 Std. nach Infektion der Versuchstiere gewonnen und bei 37°C aufbewahrt. Entnahmezeiten der Proben: 8⁰⁰, 12⁰⁰ und 16⁰⁰ Uhr

Tage nach Versuchsbeginn	pH	Bakteriologischer Befund	Eininfektions-test
Versuchsbeginn 13 ⁰⁰	6,8	Ø	5/5
1	5,4	Bact. prot.	5/5
	5,6	Bact. prot.	5/5
	5,6	Bact. coli und Strept.	5/5
2	5,6	Keime der Pseudomonasgruppe und Sarcine	5/5
	6,2	Bact. prot. und Strept.	3/4
	5,7	Bact. prot., Bact. coli und Staph.	4/4
3	6,9	Bact. prot. und Staph.	5/5
	6,4	Bact. prot. und Staph. (?)	5/5
	6,6	Bact. prot. und Staph.	5/5
4	5,7	Bact. prot. und Staph.	5/5
	7,0	Bact. prot., vereinzelt Staph.	0/5
	7,2	Bact. prot. und Staph.	0/4
5	6,4	Bact. prot. und Staph.	4/4
	6,5	Bact. prot. und Strept.	0/5
	7,4	Bact. prot. und Staph. (?)	0/4
6	6,4	Bact. prot., Strept. und grampos. Stäb.	0/5
	6,3	Bact. prot. und Strept. (?)	0/5
	7,3	Bact. prot. und Staph.	0/4
7	6,5	Bact. prot., Bact. coli und Strept.	0/5
	6,8	Bact. prot. und Strept.	0/5
	6,9	Bact. prot., grampos. Stäb. und Kokken	0/5
8	7,1	Bact. prot. und Strept. (?)	0/4
	7,0	Bact. coli und grampos. Kokken	0/5
	6,5	Bact. prot.	0/5

Tabelle 8c

Einfluß des Infektionsalters auf die Virusnachweisbarkeit. Die Lungen wurden 120 Std. nach Infektion d. Versuchstiere gewonnen und bei 37°C aufbewahrt. Entnahmezeiten der Proben: 8⁰⁰, 12⁰⁰ und 16⁰⁰ Uhr

Tage nach Versuchsbeginn	pH	Bakteriologischer Befund	Eiinfektions- test
Versuchsbeginn 13 ⁰⁰	7,3	Bact. prot.	5/5
1	5,5	Bact. prot.	4/4
	6,1	Bact. prot.	5/5
	6,0	Bact. prot.	5/5
2	6,3	Bact. prot.	5/5
	6,0	Bact. prot. und Staph.	5/5
	6,2	Bact. prot. und Strept.	5/5
3	7,1	Bact. prot. und Strept. (?)	4(5)/5
	6,8	Bact. prot. und Staph.	5/5
	6,3	Bact. prot. und Sporenbildner	5/5
4	6,6	Bact. coli und Strept.	3/3
	6,6	Bact. prot., Strept. und Staph.	5/5
	7,4	Bact. prot. und Staph.	0/5
5	7,3	Bact. prot. und Strept.	0/5
	6,7	Bact. coli und haemolyt. Strept.	3/5
	6,4	Bact. prot.	3/4
6	7,3	Bact. prot. und Staph.	0/5
	7,3	Bact. prot. und Strept.	0/5
	7,3	Bact. prot. und Strept.	0/5
7	7,2	Bact. prot. und Staph.	0/5
	7,1	Bact. prot. und Strept.	0/5
	7,0	Bact. prot. und Strept.	0/5
8	7,4	Bact. prot. und Staph.	0/5
	7,1	Bact. coli und Strept.	0/4
	6,4	Bact. prot. und Staph.	0/5

Versuchsreihe IV:

In der vierten Versuchsreihe sollte die Haltbarkeit der Infektiosität von PR8-Virus in infizierten Lungen und in gesunden Lungen, denen das Virus künstlich zugesetzt wurde, geklärt werden. Um gleiche Bedingungen für beide Ansätze zu schaffen, wurden diesmal die Lungen zerkleinert. Darüber hinaus sollte ein dritter Versuchsanstz mit natürlich infizierten und unzerkleinerten Lungen einerseits als Kontrolle dienen, zum anderen aber auch den Unterschied der Virushaltbarkeit in der Gewebseinheit und im zermahlenen Gewebe aufdecken.

Dazu wurden Swiss-Mäuse wie oben angegeben infiziert, 48 Std. nach der Infektion getötet und die entnommenen Lungen in zwei Portionen aufgeteilt. Die Lungen der Gruppe 1 wurden gewogen, mit sterilem Seesand im Mörser zerkleinert, in physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1:5 suspendiert und in ein steriles Aufbewahrungsgefäß gebracht. Die Lungen der 2. Portion wurden unzerkleinert aufbewahrt. Eine gleich große Anzahl Lungen gesunder Tiere wie in Gruppe 1 wurde zermahlen und bildete die Gruppe 3. Um diesem zerkleinerten Gewebe nun das gleiche Virusmaterial zusetzen zu können, das in Gruppe 1 enthalten war, wurden infizierte und 48 Std. post infectionem gewonnene Lungen intensiv zermahlen und im Verhältnis 1:5 mit physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Diese Suspension wurde zur besseren Virusextraktion mehrere Std. in den Kühlschrank verbracht und anschließend kurz zentrifugiert. Der nun PR 8-haltige Überstand wurde abpipettiert und über Hamelerythrocyten gereinigt. Das gereinigte Virus wurde in physiologische Kochsalzlösung aufgenommen, der Penicillin und Streptomycin zugesetzt worden waren. Diese PR 8-haltige Lösung diente nun zur Suspension der zerkleinerten gesunden Lungen im Verhältnis 1:5. Bei diesem Vorgehen wurde angenommen, daß Gruppe 1 und 3 dadurch quantitativ annähernd die gleiche Virusmenge enthalten. Zur Kontrolle wurde der Hämagglutinationstiter in beiden Versuchsansätzen bestimmt. In der Suspension der natürlich infizierten Lungen lag er bei 1:160, in der der gesunden und künstlich mit Virus versetzten Lungen bei 1:80. Die Aufbewahrungstemperatur für das Versuchsmaterial betrug 37°C. Der Nachweis der Infektiosität erfolgte auch hier durch den Eininfektionstest.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in der Tabelle 9 zusammengefaßt. Die Suspension der natürlich infizierten Lungen roch bereits nach kurzer Zeit stark faulig. Die rasch ablaufenden Verwesungsvorgänge kommen auch in dem schnell zur alkalischen Seite hin umschlagenden p_H -Wert zum Ausdruck. In dieser Gruppe war das Virus nur bis zum 2. Tag nach Versuchsbeginn nachweisbar, d.h. etwa 48 Stunden.

In der Suspension des gesunden und künstlich mit Virus versetzten Lungengewebes wurde das Bakterienwachstum durch Antibiotikazusatz hintangehalten. Dadurch handelte es sich bei diesem Versuchsansatz im wesentlichen um reine Autolysevorgänge. Der Umschlag des p_H -Wertes zur alkalischen Seite hin erfolgte hier deutlich langsamer, die Entwicklung eines kadaverösen fauligen Geruches blieb unbedeutend. Das Virus war bis zum 3. Tag nach Versuchsbeginn infektiös, d.h. etwa 72 Stunden.

Bei den zur Kontrolle unzerkleinert gebliebenen natürlich infizierten Lungen blieb die Infektiosität bis zum 5. Tag nach Versuchsbeginn erhalten, d.h. etwa 110 Stunden. Im wesentlichen stimmte dieses Ergebnis mit den in der Versuchsreihe I gewonnenen und in Tabelle 2 zusammengestellten Werten überein. Im Vergleich zu den natürlich infizierten und zerkleinerten Lungen ergab sich damit eine eindeutig längere Nachweisbarkeit der Virusinfektiosität im erhaltenen Gewebsverband.

Versuchsreihe V:

Die vorausgegangenen Versuche ließen immer wieder eine Abhängigkeit der Haltbarkeit des PR 8-Virus von der vorliegenden Wasserstoffionenkonzentration erkennen und zwar in dem Sinne, daß die Infektiosität im alkalischen Bereich in der Regel rasch verloren ging. Damit ergab sich die Frage, ob eine Virusnachweisbarkeit dann länger möglich ist, wenn man das zu untersuchende Material in einer Pufferlösung bekannter Wasserstoffionenkonzentration an Stelle der bisher verwendeten physiologischen Kochsalzlösung aufnimmt. Ein p_H -Wert von 6.5 bzw. 8.0 schien für das zu wählende Puffersystem auf Grund der vorherigen Beobachtungen am besten geeignet zu sein, den

Unterschied der Virushaltbarkeit im leicht sauren und im alkalischen Wasserstoffionenkonzentrationsbereich aufzuzeigen. Der Versuch erfuhr dadurch

Tabelle 9

Haltbarkeit der Infektiosität von Influenzavirus in unzerkleinerten Lungen (linker Teil der Tabelle), in natürlich infiziertem, zermahlenem und in physiologischer Kochsalzlösung suspendiertem Lungengewebe (mittlerer Teil der Tabelle) und in einer Suspension gesunden, zermahlenen und künstlich mit Virus versetzten Lungengewebes (rechter Teil der Tabelle)

Die natürlich infizierten Lungen wurden 48 Std. nach der Infektion gewonnen.
Aufbewahrungstemperatur: 37°C

Tage nach Versuchsbeginn		pH	Eiinfek- tionstest	pH	Eiinfek- tionstest	pH	Eiinfek- tionstest
Versuchsbeginn 18 ⁰⁰		6,2	4/4	6,1	5/5	6,2	5/5
1	16 ⁰⁰	6,1	5/5	7,4	5/5	6,4	5/5
2	8 ⁰⁰	6,9	5/5	7,5	3/3	6,6	4/5
	16 ⁰⁰	6,9	4/4	7,9	2/2	7,1	4/4
3	8 ⁰⁰	6,4	4/4	7,9	0/4	7,3	2/2
	16 ⁰⁰	6,8	5/5	8,1	0/5	7,5	3/3
4	8 ⁰⁰	7,0	0/4	8,0	0/4	7,7	0/4
	16 ⁰⁰	7,3	2/4	8,1	0/4	7,7	0/5
5	8 ⁰⁰	7,2	3/4	8,2	0/5	7,9	0/4
	16 ⁰⁰	8,0	0/4				
6	8 ⁰⁰	6,3	0/5				
	16 ⁰⁰	6,7	0/4				

eine Erweiterung, daß der Einfluß von unmittelbar nach dem Tode entnommenem Lungengewebe, von Lungengewebe, dessen Fermente und möglicherweise vorhandenen Inhibitoren durch Erwärmen auf 65°C inaktiviert wurden, und von Lungengewebe, das bereits in Verwesung übergegangen war, auf die Virushaltbarkeit vergleichend beobachtet wurde.

Als infektiöses Ausgangsmaterial diente frisch geerntete PR8-haltige Allantoisflüssigkeit. Nach Reinigung über Hammelerythrocyten wurde das Virus in einem sterilen, isotonischen Puffersystem (Dinatriumhydrogenphosphat/Natriumdihydrogenphosphat) mit einem pH-Wert von 6.5 bzw. 8,0 suspendiert (57) und – wie oben angegeben – mit Antibiotika versetzt. Ein Teil dieser Virusaufschwemmungen bildete die Gruppe 1, der Rest wurde für die Versuchsgruppen 2–4 verwendet. Diesen wurde Mäuselungengewebe, das unterschiedlich vorbehandelt worden war, zugesetzt. In der Gruppe 2 solches, das unmittelbar nach dem Tode unter aseptischen Bedingungen gewonnen worden war, in der Gruppe 3 Gewebe, das 7 Tage lang im Brutschrank bei 37°C einem intensiven Verwesungsprozeß ausgesetzt worden war, und in Gruppe 4 Lungen, deren Fermente und möglicherweise vorhandenen Inhibitoren durch Erwärmen auf 65°C (45 Minuten lang) inaktiviert wurden. Das so vorbehandelte Gewebe wurde mit sterilem Seesand zermahlen und anschließend in den virushaltigen Puffersystemen im Verhältnis 1:10 aufgeschwemmt. Dieses Verdünnungsverhältnis wurde auf Grund eines Vorversuches, in dem die Belastungsfähigkeit des Puffers untersucht worden war, gewählt. Danach wurde jeder Versuchsansatz kurz zentrifugiert, um Sand

und gröbere Gewebeteile zu entfernen. Der nun lungenextrakthaltige Überstand wurde in sterile Aufbewahrungsgefäße abgefüllt. Die Aufbewahrungstemperatur betrug 37 °C. Der Virusnachweis wurde durch den Eiinfektionstest geführt. Zusätzlich wurde das Verhalten des Hämagglutinationstiter beobachtet. Während der Versuchsdauer wurden ständig Sterilitätskontrollen angelegt und die p_H -Wertveränderungen aufgezeichnet. In den Tabellen 10–13 werden die Ergebnisse für die beiden Puffersysteme gegenübergestellt. Es fiel dabei auf, daß die Infektiosität bei dem p_H -Wert 6,5 erst zwischen dem 32. und 35. Tag nach Versuchsbeginn verloren ging, während das Virus in dem Puffersystem mit einem p_H -Wert von 8,0 bereits am 7. Tag nach Versuchsbeginn nicht mehr nachweisbar war (Tabelle 10). Enthielt das Puffersystem zusätzlich einen Extrakt aus unmittelbar nach dem Tode gewonnenem Lungengewebe, so blieb das Virus bei p_H 6,5 bis zum 5. Tag nach Versuchsbeginn infektiös. Hatte das Puffersystem dagegen eine Wasserstoffionenkonzentration von $10^{-8,0}$, so war das Virus bereits 24 Stunden nach Versuchsbeginn im Eiinfektionstest nicht mehr nachweisbar (Tabelle 11). In der 3. Versuchsgruppe wurde der Einfluß eines Extraktes aus Mäuselungen untersucht, die 7 Tage lang bei 37 °C aufbewahrt worden waren. Im sauren p_H -Bereich blieb das Virus nur noch bis zum 2. Tag nach Versuchsbeginn nachweisbar. Bei dem Versuchsansatz mit dem p_H -Wert 8,0 fiel im Gegensatz zu den vorausgegangenen Ergebnissen auf, daß sich das Virus hier genauso lange hielt wie bei einem p_H -Wert von 6,5. Auch in diesem Falle blieb es bis zum 2. Tage nach Versuchsbeginn infektiös (Tabelle 12).

In der letzten Versuchsgruppe, in welcher die Puffersysteme einen Extrakt aus Mäuselungen enthielten, die unmittelbar nach dem Tode gewonnen und anschließend in einem Wasserbad von 65 °C 45 Minuten lang hitzeinaktiviert worden waren, blieb die Infektiosität sowohl im sauren als auch im alkalischen Bereich bis zum 5. Tag nach Versuchsbeginn erhalten (Tabelle 13).

Bei den Versuchsreihen fiel auf, daß der Hämagglutinationstiter im alkalischen Bereich oft eine Titrationsstufe unter dem im sauren Bereich lag. Eine Beeinflussung der Hämagglutination durch die verschiedenen Lungenextrakte wurde nicht beobachtet.

Versuchsreihe VI:

Das folgende abschließende Experiment entstand auf Grund von Beobachtungen, die während der Arbeiten an der vorausgegangenen Versuchsreihe gemacht wurden.

PR8-Virus aus Allantoisflüssigkeit wurde über Hammelerythrocyten gereinigt und in den oben beschriebenen isotonischen Phosphatpufferlösungen mit einem p_H -Wert von 6,5 bzw. 8,0 suspendiert. Im Gegensatz zum vorausgegangenen Versuch wurde das Material bis zur Weiterverwendung 2 Tage lang bei –20 °C aufbewahrt. Vor dem Einfrieren lag der Hämagglutinationstiter beider Virussuspensionen bei 1:2560. Nach dem Auftauen war er auf 1:20 abgesunken. Eine Kontrolle der Virulenz für 11 Tage alte Hühnerembryonen ergab jedoch einen Titer, der zwischen 10^{-4} und 10^{-5} lag, d.h. es war eine ausreichende Infektiosität vorhanden. Wie im vorherigen Versuch wurden den beiden virushaltigen Pufferlösungen die entsprechenden Mäuselungenextrakte zugesetzt. Lediglich auf den Zusatz von bei 65 °C hitzeinaktiviertem Gewebe wurde verzichtet. Aufbewahrungstemperatur 37 °C; der Virusnachweis wurde durch den Eiinfektionstest geführt.

Es fiel bei diesem Versuch auf, daß die Infektiosität des Virus bei den Ansätzen, die einen Lungenextrakt enthielten, im Gegensatz zur Versuchsreihe V sehr schnell verloren ging. Es mußte angenommen werden, daß die Widerstandskraft des Virus durch das vorausgegangene Einfrieren gelitten hatte. Daneben wurde jedoch auch an die Möglichkeit gedacht, daß Inhibitoren den Virusnachweis verhinderten. Um diese möglicherweise vorhandenen Faktoren auszuschalten, wurden zwei Wege beschritten. Einmal wurde durch Zusatz von 1/10 n Salzsäure die Wasserstoffionenkonzentration auf Werte zwischen $10^{-5,7}$

Tabelle 10

Haltbarkeit von PR8-Virus in einem isotonischen Puffersystem (Dinatriumhydrogenphosphat/Natriumdihydrogenphosphat) mit einem p_H -Wert von 6,5 (linker Teil der Tabelle) bzw. 8,0 (rechter Teil der Tabelle). Aufbewahrungstemperatur: 37°C

Tage nach Versuchsbeginn	Entnahmezeit	p_H	HA-Titer (reziproker Wert)	Eiinfektions-test	p_H	HA-Titer (reziproker Wert)	Eiinfektions-test
Versuchsbeginn	14 ³⁰	6,5	5120	5/5	7,9	5120	5/5
1	16 ¹⁵	6,5	5120	5/5	7,9	2560	5/5
2	15 ³⁰	6,5	5120	5/5	7,9	2560	4/4
3	17 ⁰⁰	6,5	2560	5/5	7,8	2560	5/5
4	16 ¹⁰	6,5	2560	5/5	7,7	5120	5/5
5	13 ⁴⁵	6,5	5120	5/5	7,7	2560	4/5
6	13 ³⁰	6,5	5120	4/5	7,6	2560	1/5
7	14 ³⁰	6,5	5120	5/5	7,7	2560	0/5
8	16 ⁴⁵	6,5	5120	5/5	7,7	2560	0/5
16	15 ³⁰	6,5	5120	5/5			
22	10 ¹⁵	6,5	10240	4/4			
30	17 ³⁰	6,5	5120	4/5			
32	15 ³⁰	6,5	5120	4/5			
35	13 ⁴⁵	6,5	10240	0/5			
38	13 ⁰⁰	6,5	10240	0/4			

Tabelle 11

Haltbarkeit von PR8-Virus in einem isotonischen Puffersystem mit einem p_H -Wert von 6,5 (linker Teil der Tabelle) bzw. 8,0 (rechter Teil der Tabelle), dem ein Extrakt aus unmitttelbar nach dem Tode gewonnenem Mäuselongewebe zugegeben wurde. Aufbewahrungstemperatur: 37°C.

Tage nach Versuchsbeginn	Entnahmezeit	p_H	HA-Titer (reziproker Wert)	Eiinfektions-test	p_H	HA-Titer (reziproker Wert)	Eiinfektions-test
Versuchsbeginn	14 ³⁰	6,5	5120	5/5	7,8	2560	5/5
1	16 ¹⁵	6,5	5120	4/4	7,7	2560	0/5
2	15 ³⁰	6,5	2560	2/4	7,7	1280	0/5
3	17 ⁰⁰	6,5	2560	3/4			
4	16 ¹⁰	6,5	5120	3/4			
5	13 ⁴⁵	6,5	2560	2/4			
6	13 ³⁰	6,5	2560	0/5			
7	14 ³⁰	6,5	2560	0/5			

und 10^{-5,8} erhöht, um dadurch die Inhibitoren unwirksam zu machen. Parallel dazu wurde ein Teil des Untersuchungsmaterials mit Kaliumperjodat versetzt, um Inhibitoren zu inaktivieren. (Dazu wurden je 0,153 g KJO₄ (frisch hergestellt) in 20 ml der verwendeten Phosphatpuffer (p_H 6,5 und 8,0) gelöst, so daß eine 1/30 molare Lösung entstand). Ein Teil dieser Perjodatlösung wurde mit 4 Teilen des entsprechenden virushaltigen Versuchsansatzes vermischt, so daß eine 1/150 molare Perjodatkonzentration entstand. Die Einwirkungszeit des KJO₄ betrug 30 Min. bei Zimmertemperatur. Anschließend wurde ein Teil 10%iges Glycerinphosphat zugegeben, um die Oxydationswirkung des Perjodates zu unterbrechen. Die virushaltigen Pufferlösungen, die keinen Lungenextrakt enthielten und aus denen das Virus durch den Eiinfektionstest über den 2. Tag nach Versuchsbeginn hinaus noch isoliert werden konnte, wurden zur Kontrolle ebenso vorbehandelt. Anschließend wurde geprüft, ob diese Maßnahmen geeignet waren, die eventuell vorhandenen Inhibitoren auszuschalten.

Die Ergebnisse zeigten, daß es in keinem Falle möglich war, die verlorengegangene Infektiosität zurückzuerhalten. Da auch die Hämagglutinationstiter keinen Anstieg nach Zusatz der oben genannten Chemikalien zeigten, wurde auf eine tabellarische Zusammenstellung der Ergebnisse verzichtet.

Auffallend war bei denjenigen Versuchsansätzen, die zur Kontrolle dienten, daß der Salzsäurezusatz vom Virus wesentlich besser vertragen wurde als die Zugabe von Perjodat.

Tabelle 12

Haltbarkeit von PR 8-Virus in einem isotonischen Puffersystem mit einem pH-Wert von 6,5 (linker Teil der Tabelle) bzw. 8,0 (rechter Teil der Tabelle), dem ein Extrakt aus Mäuselebergewebe zugegeben wurde, das 7 Tage lang bei 37° C einem Fäulnisprozeß ausgesetzt worden war.

Aufbewahrungstemperatur: 37° C

Tage nach Versuchsbeginn	Entnahmezeit	pH	HA-Titer (reziproker Wert)	Eiinfektionstest	pH	HA-Titer (reziproker Wert)	Eiinfektionstest
Versuchsbeginn	14 ³⁰	6,6	5120	5/5	7,7	5120	5/5
1	16 ¹⁵	6,6	2560	2/3	7,7	2560	2/4
2	15 ³⁰	6,6	2560	1/4	7,7	2560	2/5
3	17 ⁰⁰	6,5	2560	0/3	7,6	1280	0/5
4	16 ¹⁰	6,6	2560	0/5	7,5	2560	0/5

Tabelle 13

Haltbarkeit von PR 8-Virus in einem isotonischen Puffersystem mit einem pH-Wert von 6,5 (linker Teil der Tabelle) bzw. 8,0 (rechter Teil der Tabelle), dem ein Extrakt aus Mäuseleungen zugegeben wurde, die unmittelbar nach dem Tode gewonnen und anschließend in einem Wasserbad bei 65° C 45 Min. lang aufbewahrt worden waren.

Aufbewahrungstemperatur: 37° C

Tage nach Versuchsbeginn	Entnahmezeit	pH	HA-Titer (reziproker Wert)	Eiinfektionstest	pH	HA-Titer (reziproker Wert)	Eiinfektionstest
Versuchsbeginn	14 ³⁰	6,5	5120	5,5	7,9	2560	5/5
1	16 ¹⁵	6,5	2560	3/3	7,6	1280	5/5
2	15 ³⁰	6,5	2560	2/5	7,6	2560	5/5
3	17 ⁰⁰	6,5	2560	2/5	7,6	2560	2 (3)/5
4	16 ¹⁰	6,4	2560	2 (3)/5	7,6	2560	2 (3)/5
5	13 ⁴⁵	6,4	2560	1/5	7,5	2560	1/5
6	13 ³⁰	6,4	2560	0/5	7,5	2560	0/5
7	14 ³⁰	6,4	5120	0/5	7,5	2560	0/5

Besprechung der Versuchsergebnisse

Neben den für eine Influenza charakteristischen Symptomen bilden die Isolierung des Virus aus dem Rachenspülwasser und die serologischen Methoden (Hirst-Test, Komplementbindungsreaktion) die Hauptgrundlagen der Grippediagnostik. Nur in den Fällen der Erkrankung, die zu einem letalen Ausgang führen, kommt der Virusnachweis im Gewebe des Respirationstraktes zur Anwendung. Auch diese „verspätete Diagnose“ hat ihre volle Berechtigung. Das Bundes-Seuchen-Gesetz verlangt u.a. auch die Meldung von Grippeto-

desfällen, woraus sich die Notwendigkeit einer sicheren virologischen Diagnose ergibt. Daher muß versucht werden, alle die Faktoren aufzuzeigen, die den Erregernachweis im postmortal entnommenen Gewebe verhindern können.

Die durchgeführten Untersuchungen erstrecken sich hauptsächlich auf die Ursache der Virusschädigung, d. h. auf die Klärung der Fragen nach den Einflüssen physikalischer, chemischer und bakteriologischer Art, weniger auf die Frage nach dem „wie“ des Einflusses dieser Faktoren.

Die Influenza kann zu einer hämorrhagischen Entzündung des Respirationstraktes führen. In einer Gewebsaufschwemmung erkrankter Organteile werden sich daher reichlich Erythrocytenmembranen, z. T. auch von der Zerkleinerung des Gewebes nicht erfaßte rote Blutzellen finden. Diese menschlichen roten Blutzellen aller Blutgruppen verhalten sich hinsichtlich Adsorption, Agglutination und Elution im Vergleich zu Hühnerblutaufschwemmungen sogar praktisch gleichwertig (BIELING, 7; MARCUSE und BEEKE, 48), es tritt also eine Haemagglutination ein. Weiterhin wies HIRST (30) an Frettchenlungen nach, daß intratracheal zugeführtes Virus von den Lungenzellen schnell in großer Menge adsorbiert und nach kurzem Intervall wieder freigegeben wird. Danach war die Adsorptionsfähigkeit der Lungenzellen für neues Virus erloschen. BIELING und OELRICHS (8) zeigen, daß auch Zellen und Extrakte parenchymatöser Organe das Virus hemmen können. Die Organezellen wurden zwar nicht agglutiniert, doch war anzunehmen, daß ein Teil des Virus an die Zelloberfläche gebunden wurde. Außerdem fanden sie, daß in normalen und frisch infizierten Organextrakten Hemmungsstoffe vorkamen, die trotz starker Erwärmung nicht zerstört wurden. Allerdings wurde durch sie nur die Haemagglutination, nicht aber die Übertragbarkeit des Virus auf empfängliche Tiere und Hühnereier beeinflusst.

Bei dem Untersuchungsgang an virushaltigem Gewebe wird dieses unter ständiger Kühlung oder bei Zimmertemperatur zerkleinert, suspendiert und anschließend zentrifugiert. Es ist daher anzunehmen, daß eine gewisse Virusmenge dem Nachweis entzogen wird, indem ein Teil der Erreger an erhalten gebliebene Organezellen und an Zelltrümmer adsorbiert wird, um bei der folgenden Zentrifugierung sedimentiert zu werden. Sicher wird auch eine geringe freie Virusmenge von den Schwebeteilchen mit zu Boden gerissen.

Das Ergebnis des Vorversuches zeigt: Eine Suspension natürlich infizierter Mäuselungen, die in der Kälte (2°C) bearbeitet wurde, wies nach dem Zentrifugieren einen Haemagglutinationstiter von 1:80 auf. Eine Resuspension des Bodensatzes, eine anschließende Aufbewahrung und erneute Zentrifugierung bei 37°C steigerte den Titer auf 1:1280. Durch Elution konnte der Virusverlust verringert werden.

Die Infektiosität blieb während dieses Versuches jedoch unverändert. Die zur Bestimmung der ID₅₀ gewählten Verdünnungsstufen waren offensichtlich zu groß, denn jedes Röhrchen enthielt nur 10% der Virusmenge des vorhergehenden, so daß ein möglicherweise eingetretener Rückgang in der Infektiosität durch die verringerte Zahl der pathogenen Teilchen nicht erfaßt werden konnte. Darüber hinaus muß berücksichtigt werden, daß es sich bei dem verwendeten Stamm um ein hochvirulentes (die ID₅₀ lag bei 10^{-8,25}), an Hühnerembryonen und Mäuse adaptiertes Virus handelte, bei dem eine Verringerung der Zahl der Virusteilchen sich sicher nicht so schwerwiegend auswirkte wie bei einem neu anzuzüchtenden Stamm. Aus diesem Grunde wurde auch in den folgenden Versuchsreihen auf eine Weiterverarbeitung der infizierten Lungen bei 37°C verzichtet.

Für die virologische Diagnostik wird jedoch vorgeschlagen, Organaufschwemmungen vor der Zentrifugierung 30 bis 45 Minuten bei 37°C aufzu-

bewahren, um einen allzugroßen Virusverlust durch Adsorptionsvorgänge zu verhindern.

In der Versuchsreihe I wurde das Verhalten der Viren in unzerkleinerten Lungen untersucht, die 48 Stunden nach Infektion der Versuchstiere gewonnen worden waren. Neben den Faktoren Zeit, Temperatur und Wasserstoffionenkonzentration sollte der Einfluß zugesetzter Staphylokokken und Streptokokken beobachtet werden. Bei 37° C ließ sich das Virus bis zum 3. Tag nach Versuchsbeginn nachweisen, gleichgültig, ob dem Material Staphylokokken oder Streptokokken zugesetzt worden waren. Lag die Aufbewahrungstemperatur zwischen 22° C und 23° C, dann blieb die Infektiosität in den Lungen ohne künstlichen Bakterienzusatz und in denjenigen, die mit Staphylokokken versetzt worden waren, bis zum 21. bzw. 19. Tage erhalten, d. h. etwa 7mal länger als bei 37° C. Ein Streptokokkenzusatz verkürzte bei dieser Temperatur die Virushaltbarkeit jedoch recht erheblich. Nur bis zum 14. Tag blieb hier die Infektiosität nachweisbar. Bei 9° C verhielt sich das Virus unter den gewählten Bedingungen recht unterschiedlich. Am längsten (bis zum 76. Tag) blieb es in den Proben mit einem Staphylokokkenzusatz vermehrungsfähig. Bis zum 56. Tag konnte es in der Gruppe, der Streptokokken beigegeben worden waren, nachgewiesen werden. Dagegen hielt sich die Pathogenität in den Lungen ohne Bakterienzusatz nur bis zum 42. Tag. Bei -20° C konnte das Virus sogar über den 200. Tag hinaus aus den Lungen isoliert werden.

Die unterschiedliche Haltbarkeit der einzelnen Versuchsansätze könnte auch durch die Einwirkung von Fermenten zustandekommen. Gewöhnlich wird die Reaktionsgeschwindigkeit der Enzyme durch eine Temperaturerhöhung um 10° C auf das Doppelte gesteigert (RGT-Regel). Dieses Verhältnis läßt sich jedoch nicht so ohne weiteres auf die vorliegenden Versuche übertragen, denn diese Beziehung setzt gleichbleibende Wasserstoffionenkonzentration, konstante Ionenverhältnisse usw. voraus. Während des Gewebszerfalls kommt es jedoch zu so zahlreichen Veränderungen der einzelnen Faktoren, daß eine Aussage über die Virusbeeinflussung durch Fermente bei diesem Versuch nicht gemacht werden konnte. Erschwerend kommt noch hinzu, daß es sich hierbei fast nie um eine reine Autolyse handelt, sondern daß es durch die Begleitkeime zur Fäulnis kommt. Während der Aufbewahrungszeit wurde eine allmähliche Verschiebung der Wasserstoffionenkonzentration von schwach sauren zu leicht alkalischen p_H -Werten hin beobachtet. Dieser Zustand wurde bei höheren Temperaturen wesentlich schneller erreicht. Bei -20° C blieb dieser Effekt jedoch aus, da hier weder die Fermente noch die Bakterien wirksam werden konnten. Es fiel nun auf, daß mit dem Erreichen eines alkalischen p_H -Wertes das Virus seine Infektionsfähigkeit in der Regel rasch verlor. Diese Beobachtung stand im Gegensatz zu den in der Literatur bekannt gewordenen Feststellungen, wonach das Influenzavirus im schwach alkalischen Bereich seine größte Haltbarkeit besitzen sollte. Die Deutung dieses Phänomens ist nicht einfach. Die einfachste Möglichkeit wäre die, daß das Virus allein durch die wechselnde Wasserstoffionenkonzentration geschädigt wird. Weiterhin wäre denkbar, daß in einem so veränderten Milieu Fermente wirksam werden, die in diesem Bereich ihr p_H -Optimum besitzen und so das durch die vorausgegangene Aufbewahrung bei ungünstigen Temperaturen vorgeschädigte Virus angreifen können. Dafür würde auch die Tatsache sprechen, daß tierische Organe für

den Substratabbau u. a. ein Optimum bei p_H 7,3 bis 7,5 haben (72). Andererseits besteht auch die Möglichkeit, daß bestimmte Substanzen, die im Verlauf der Gewebszersetzung entstehen und so das Milieu vielleicht zur alkalischen Seite hin verschieben, den Virusnachweis verhindern, sei es, daß sie das Virus direkt schädigen, sei es, daß sie bestimmte Oberflächenbezirke besetzen oder angreifen, die für die Adsorption an Zelloberflächen und für den Eintritt in die Zellen und damit für die Infektion notwendig sind. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, daß basische, synthetische Lysinpolypeptide das Influenzaviruswachstum im Hühnerei hemmen (60), daß die basischen Aminosäuren Arginin, Lysin und Ornithin das Wachstum von PR8- und Lee-Stämmen in der Gewebekultur aufhalten können (49a) und daß auch Harnstoff die Infektiosität von Influenzavirus zu zerstören vermag (71). Damit wäre also nicht der alkalische p_H -Wert verantwortlich für den Verlust der Pathogenität, sondern er wird lediglich zum Indikator für das Vorhandensein derartiger hemmend wirkender Abbauprodukte. Schließlich könnte diese Veränderung der Wasserstoffionenkonzentration auch durch die vorhandenen Begleitbakterien bedingt sein. In der Tat zeigen die bakteriologischen Befunde, daß im größten Teil der Lungenabstriche *Bacterium proteus* vorhanden ist, d. h. ein Keim, der alkalisch reagierende Stoffwechselprodukte zu bilden vermag. Da sich in den Lungen noch zahlreiche andere Keime fanden, war eine klare Aussage über den Einfluß von Bakterien auf die Viren nicht möglich.

Aus diesem Grunde wurde in der Versuchsreihe II der Einfluß von *Staphylococcus aureus haemolyticus*, haemolytischen Streptokokken der Gruppe A, *Bacterium proteus* und *Pseudomonas aeruginosa* auf Haemagglutination und Infektiosität einer PR8-haltigen Allantoisflüssigkeit untersucht. Von den geprüften Keimen verursachten bis zum 12. Tag nach Versuchsbeginn die Streptokokken einen leichten, die *Pyocyaneus*-bakterien einen deutlichen Abfall des Haemagglutinationstiters (Tabelle 5). Dabei hatten die Streptokokken den p_H -Wert von 7,3 zu Beginn auf 6,3 gegen Ende des Versuches verschoben. Mit großer Wahrscheinlichkeit ist der geringe Titerverlust auf diese Änderung der Wasserstoffionenkonzentration zurückzuführen, konnte doch TISCHER (69) nachweisen, daß die Hämagglutinationstiter von PR8-Virus im alkalischen Bereich etwas höher liegen als im schwach sauren Milieu. *Pseudomonas aeruginosa* schien dagegen das Haemagglutinin direkt zu beeinflussen. Einmal änderte sich hier der p_H -Wert von 7,6 auf 8,5, d. h. es handelte sich um ein für die Haemagglutination günstiges Milieu, zum anderen kam es zu einem signifikanten Titerabfall auf Werte unter 1:20. Auch die Tatsache, daß dieser Titerabfall bei Zimmertemperatur und bei Aufbewahrung im Kühlschrank – also bei verminderter Bakterientätigkeit – ausblieb, unterstützte die Annahme, daß das Haemagglutinin von *Pseudomonas aeruginosa* direkt geschädigt wurde, zumal auch der in einem bakterienfreien Kulturfiltrat enthaltene Farbstoff Pyocyanin den Haemagglutinationstiter bei unterschiedlichen Aufbewahrungstemperaturen nicht veränderte.

Wesentlich empfindlicher als das Haemagglutinin verhielt sich die Infektiosität von PR8-Virus gegenüber Bakterieneinfluß (Tabellen 6 und 7). In dem Kontrollansatz, dessen p_H -Wert bei 7,5 lag, blieb das Virus über den 12. Tag nach Versuchsbeginn hinaus vermehrungsfähig. Der Zusatz einer bakterienhaltigen Bouillon führte dagegen in allen untersuchten Fällen zum Verlust der Infektiosität vor dieser Zeit. Am eindrucksvollsten war dabei die Wirkung der haemolytischen Streptokokken, die – obwohl sie selbst am 3.

Versuchstag aus dem Ansatz nicht mehr angezüchtet werden konnten – einen Virusnachweis nur bis zum 4. Tag nach Versuchsbeginn zuließen. Schon innerhalb kurzer Zeit kam es in ihrer Gegenwart zu einer Säuerung des Milieus, die p_H -Werte lagen zwischen 5,6 und 5,8.

Fast ebenso schnell verlor das Virus unter dem Einfluß von *Pseudomonas aeruginosa* seine Infektiosität. In Gegenwart dieses Keimes verschob sich das Milieu von einem anfänglichen p_H von 7,2 auf Werte, die zwischen 7,9 und 8,0 lagen. Nur bis zum 5. Tag nach Versuchsbeginn war der Virusnachweis durch den Einfeldtest möglich. Noch schneller erlosch die Vermehrungsfähigkeit unter dem Einfluß eines bakterienfreien Kulturfiltrates dieses Keimes. Bei einem gleichbleibenden p_H -Wert von 7,9 kam es schon am 3. Tag nach Versuchsbeginn zu einer allmählichen Abnahme der Infektiosität, und am 4. Tag konnte das Virus nur noch in einem von fünf verwendeten Hühnereiern angezüchtet werden.

Im Gegensatz zu Streptokokken und *Pyocyanus*-Bakterien war der Einfluß von *Bacterium proteus* und *Staphylococcus aureus haemolyticus* wesentlich geringer. Die Wasserstoffionenkonzentrationen waren im Vergleich zum Kontrollansatz (p_H 7,5) nur wenig verändert. Sie lagen in den Röhrchen mit Proteuszusatz zwischen p_H 7,5 und 7,7 und in denen, die Staphylokokken enthielten, zwischen 7,0 und 7,3 (7,4). Die Staphylokokken führten am 10. Tag nach Versuchsbeginn zum Verlust der Infektiosität, die Proteuskeime am 11. Tag.

Als Faktoren, die zum Verlust der Virusinfektiosität durch Bakterieneinfluß führen, könnten gelten:

1. Die Keime verändern den p_H -Wert und schädigen dadurch die Viren.
 2. Damit eng verknüpft ist die Bildung von Substanzen (Stoffwechselprodukte, extrazellulär gebildete Stoffe usw.), die entweder die Viren allein zu schädigen vermögen oder aber im Verein mit der veränderten Wasserstoffionenkonzentration die Virusteilchen beeinflussen.
 3. Schließlich wäre aber auch an eine direkte Einwirkung der Bakterien auf die Viren zu denken, sei es, daß für die Infektion wichtige Teilfunktionen (z. B. die enzymatische Aktivität, die den Kontakt mit der Zelle vermittelt) zerstört werden, sei es, daß es zu einer vollständigen Lyse kommt.
- Die Streptokokken wirken wohl hauptsächlich durch die Veränderung der Wasserstoffionenkonzentration, denn durch den Abbau von Polysacchariden wird Milchsäure angereichert. Welche Bedeutung darüber hinaus den extrazellulär gebildeten Fermenten Streptokinase und Streptodornase für den Virusnachweis zukommt, kann nicht mit Sicherheit ausgesagt werden. Der Einfluß der Streptokinase scheint weniger wichtig zu sein. Dagegen könnte die Streptodornase eher wirksam werden, da sie auf Desoxyribonukleinsäure einwirkt, allerdings nur dann, wenn die entsprechenden Zellen oder Erreger, die diesem Ferment ausgesetzt werden, vorgeschädigt sind (25).
- Pseudomonas aeruginosa* scheint dagegen auf das Virus hauptsächlich durch die Bildung von *Pyocyanin* und *Pyocyanase* einzuwirken. Beide Stoffe gehören mit zu der Antibiotikagruppe (25). Auch das bakterienfreie Kulturfiltrat führt zu einem sehr schnellen Verlust der Virusinfektiosität.

Bacterium proteus und Staphylokokken wirken ebenfalls wohl durch Stoffe, die sich während der Versuchszeit gebildet haben, ohne daß ein

nennenswerter Unterschied der Wasserstoffionenkonzentration gegenüber dem Kontrollansatz zu beobachten ist.

In der Versuchsreihe III wurde der Einfluß des Infektionsalters auf die Virusnachweisbarkeit untersucht. Dabei fand sich der höchste Virusgehalt in den Lungen, die 72 Stunden nach der Infektion der Versuchstiere gewonnen wurden. Wäre der Nachweis vermehrungsfähigen Virus' allein vom Virusgehalt abhängig, so müßten wir 72 Stunden nach der Infektion die höchste Überlebensrate erwarten. Die Versuchsergebnisse zeigen jedoch, daß das Virus in den Lungen kurz nach der Infektion am haltbarsten war, nämlich bis zum 7. Tag nach Versuchsbeginn. Dagegen konnte es aus den Geweben, die 72 bzw. 120 Stunden p. i. gewonnen wurden, nur bis zum 5. Tag isoliert werden. Der Grund dafür ist sicher in mehreren Faktoren zu suchen. So muß durchaus damit gerechnet werden, daß das Virus zu Beginn einer Infektion, also gleichsam in statu nascendi, wesentlich haltbarer ist als bei bereits länger bestehender Krankheit. Daneben ist zu berücksichtigen, daß mit zunehmender Infektionsdauer die Sekundärinfektionen immer bedeutender werden. Dafür spricht das Verhalten der Wasserstoffionenkonzentration. Während sich das Milieu in den Lungen, die 24 Stunden p. i. gewonnen wurden, erst am 8. Tag zur alkalischen Seite hin verschob, war diese Veränderung in den beiden anderen Versuchsansätzen schon sehr viel eher zu beobachten. Schon am 4. Tag nach Versuchsbeginn fand sich in dem Gewebe, das 72 Stunden p. i. gewonnen wurde, ein p_H -Wert von 7,0 bzw. 7,2. Betrug die Krankheitsdauer 5 Tage, so war diese Erscheinung schon vom 3. Tage an zu beobachten, und vom 6. Tage an lagen alle Proben bei einem p_H zwischen 7,0 und 7,3. Auch während dieses Versuches wurde beobachtet, daß eine schwach alkalische Reaktion der faulenden Umgebung mit einem Verlust der Infektiosität der Viren einherging. Die überzeugendsten Beispiele dafür zeigen die auf Seite 319 – 321 wiedergegebenen Teile der Tabelle 8.

Schließlich ist zu erwarten, daß nach einer bestimmten Krankheitsdauer die Bildung von Antikörpern einsetzt, die dann zu einer weiteren Erschwerung der Virusnachweisbarkeit führt. Dieser Zustand wurde bei den für diese Versuchsreihe gewählten Zeiten nach der Infektion wohl noch nicht erfaßt. 72 Stunden nach der Infektion war eine Antikörperbildung noch nicht zu erwarten, am 5. Tag der Erkrankung wäre sie denkbar gewesen. Dennoch blieb das Virus in beiden Fällen bis zum 5. Tag nach Versuchsbeginn nachweisbar, d. h. der Effekt einsetzender Abwehrreaktionen auf die Anzüchtbarkeit von Virus wäre erst nach dem 5. Versuchstage zu erwarten.

Übertragen wir diese Ergebnisse auf die praktische Virusdiagnostik, so kann gesagt werden, daß die Aussicht auf eine erfolgreiche Erregerisolation um so größer sein wird, je kürzer der Zeitpunkt der Infektion zurückliegt.

Die Ergebnisse der Versuchsreihe IV (Tab. 9), zeigen, daß das Virus aus der Suspension natürlich infizierter Lungen schon am 3. Tag nach Versuchsbeginn nicht mehr isoliert werden konnte. Eine Kontrolle der Wasserstoffionenkonzentration ergab, daß sich der p_H -Wert innerhalb von 20 Stunden von 6,1 auf 7,4 verschoben hatte, und diese Alkalinisierung des Milieus nahm während der Versuchsdauer ständig zu. Im natürlich infizierten, aber unzerkleinerten Gewebe erfolgte diese Änderung der Wasserstoffionenkonzentration sehr viel langsamer. Das Virus behielt bis zum 5. Tag nach

Versuchsbeginn seine Pathogenität. – Der schnellere Infektiositätsverlust im zerkleinerten Gewebe hat sicher mehrere Gründe. Es ist anzunehmen, daß das Virus, wenn es aus dem Gewebsverband herausgerissen wird, den Umwelteinflüssen gegenüber schutzloser ist als im unzerkleinerten Organ. Daneben werden durch die Zerstörung der Zellen reichlich Enzyme freigesetzt, so daß die Zerfallsvorgänge sehr viel schneller ablaufen. Eine Antwort auf die Frage, ob es die Fermente sind, die zum Infektiositätsverlust führen oder aber die entstehenden Abbauprodukte, konnte auch dieser Versuch nicht bringen; beide Möglichkeiten wären unter diesen Bedingungen denkbar. Dagegen ließ der Versuch klar erkennen, daß es durch Bakterienwirkung im zerfallenden Gewebe zum schnelleren Verlust der Infektiosität kam. Dies geht aus einem Vergleich des mittleren und rechten Teiles der Tabelle 9 hervor. In der Aufschwemmung natürlich infizierter Lungen, die ohne Antibioticazusatz blieb, kam es zu einer schnellen Verschiebung des Milieus zur alkalischen Seite hin, das Virus war schon am 3. Tag nach Versuchsbeginn im Hühnerei nicht mehr anzüchtbar. Die Suspension gesunden Lungengewebes, der das Virus erst nachträglich zugesetzt und die mit Antibiotica versetzt worden war, zeigte einen langsameren Umschlag der Wasserstoffionenkonzentration zur alkalischen Seite hin, das Virus behielt bis zum 3. Tag nach Versuchsbeginn seine Infektiosität.

Der Einfluß von Extrakten unterschiedlich vorbehandelten Lungengewebes in einem sauren und alkalischen Milieu auf Hämagglutination und Infektiosität von PR8-Virus sollte weitere Aufklärung darüber geben, wie sich das Virus unterschiedlichen Wasserstoffionenkonzentrationen gegenüber verhält. Gleichzeitig sollten die Bedeutung der Fermentwirksamkeit und die Einwirkung von Abbauprodukten auf den Virusnachweis genauer untersucht werden (Tab. 10–13.). Entgegen der in der Literatur allgemein vertretenen Ansicht, daß das Influenzavirus im schwach alkalischen Bereich seine größte Haltbarkeit habe, konnte beobachtet werden, daß die Infektiosität des verwendeten PR8-Virus bei Benutzung eines isotonischen Phosphatpuffers bei einem p_H -Wert von 6,5 sehr viel länger erhalten blieb als bei p_H -Werten, die zwischen 7,7 und 7,9 lagen. Im ersteren Falle war es bis zum 32. Tag nach Versuchsbeginn im Hühnerei anzüchtbar, im letzteren erfuhr es schon am 6. Tage nach Versuchsbeginn eine starke Abnahme seiner Infektiosität, die nach weiteren 24 Stunden schließlich ganz erlosch. Ein Zusatz von Extrakten unterschiedlich vorbehandelten Gewebes verringerte in allen Fällen die Haltbarkeit gegenüber der reinen Puffer-Virus suspension. Das Hämagglutinationsvermögen zeigte während der Versuchsdauer keine wesentlichen Titerverluste. Damit konnte eine Einwirkung von Inhibitoren weitgehend ausgeschlossen werden. – Wurde der Extrakt aus gesunden Lungen hergestellt, die unmittelbar nach dem Töten der Mäuse gewonnen wurden, so blieb das Virus bei schwach saurer Reaktion bis zum 5. Tag nach Versuchsbeginn nachweisbar, bei schwach alkalischem Milieu verlor es demgegenüber schon innerhalb der ersten 24 Stunden die Infektiosität. Da angenommen werden mußte, daß in einem solchen Extrakt zahlreiche Fermentaktivitäten vorhanden waren, lag die Vermutung nahe, daß das Virus von Enzymen geschädigt wurde, die ihr p_H -Optimum im alkalischen Bereich hatten. Diese Überlegung mußte aber dahingehend vervollständigt werden, daß die bei höherer Fermentwirksamkeit reichlicher entstehenden Abbauprodukte ebenso zum Infektiositätsverlust führen konnten. Diese Vermutung erfuhr durch

die in Tabelle 12 aufgeführten Ergebnisse sogar eine Bestätigung. Hier wurde das Virus der Einwirkung von Extrakten ausgesetzt, die aus 7 Tage lang bei 37°C aufbewahrttem Lungengewebe gewonnen wurden. Nach einer solchen Vorbehandlung des Gewebes sind nur noch geringe Fermentaktivitäten zu erwarten, der Gehalt an Abbau- und Endprodukten des Gewebszerfalls dagegen ist groß. Sowohl bei saurer als auch bei alkalischer Reaktion war schon nach 24 Stunden eine deutliche Abnahme der Infektiosität zu beobachten, und am 3. Tag nach Versuchsbeginn war das Virus im Hühnerei nicht mehr anzüchtbar. Damit war die Frage nach der Bedeutung von Abbauprodukten und Fermentwirksamkeit auf die Virusnachweisbarkeit überwiegend zugunsten der Abbauprodukte beantwortet. Doch kann eine Beeinflussung des Influenzavirus durch Enzyme nur dann mit Sicherheit ausgeschlossen werden, wenn in gezielten Versuchen mit Fermenten gearbeitet werden kann, deren Vorkommen im Lungengewebe bewiesen ist; dies ist aber auf Grund der mangelnden Kenntnisse über Autolyse und Enzymgehalt der Respirationsorgane noch nicht möglich.

Schließlich wurde der Einfluß eines Extraktes aus Lungen auf das Virus untersucht, der 45 Minuten lang bei 65°C gehalten wurde. Dadurch wurden Fermente und möglicherweise vorhandene thermolabile Inhibitoren zerstört. Auch das Auftreten von Abbauprodukten war nunmehr nicht zu erwarten. Dennoch blieb die Infektiosität sowohl im sauren als auch im alkalischen Bereich nur bis zum 5. Tag nach Versuchsbeginn erhalten. Es ist anzunehmen, daß die denaturierten Gewebsproteine für diesen Effekt verantwortlich sind, zumal eine Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration nicht beobachtet werden konnte. Entweder entwickeln sie eine hemmende Wirkung auf das Virus oder sie umhüllen den Elementarkörper und verhindern so eine Vermehrung. In einer fermenthaltigen Umgebung, wie sie bei jedem Gewebszerfall gefunden wird, werden solche Hüllen sicher rasch abgebaut.

Zusammenfassung

Der Einfluß des Gewebszerfalls auf die Virusnachweisbarkeit wurde am PR 8-Virus und Mäuselungengewebe untersucht.

1. Aufarbeitung des Untersuchungsmaterials unter ständiger Kühlung förderte die Adsorption von Virus an Zellmembranen. Erwärmen der Gewebesuspension auf 37°C vor dem Zentrifugieren setzte den Virusverlust herab.
2. In durch Inhalation infizierten Mäuselungen, die 48 Std. nach der Infektion gewonnen und die z.T. mit Staphylokokken oder Streptokokken versetzt worden waren, blieb das Virus bei Brutschranktemperatur bis zum 3. Tag nach Versuchsbeginn nachweisbar; bei 22–23°C schwankte die Haltbarkeit in Abhängigkeit vom Bakterienzusatz zwischen 14 und 21 Tagen, und bei 3°C zwischen 42 und 76 Tagen. Bei –20°C aufbewahrt, blieb das Virus über den 200. Tag hinaus vermehrungsfähig.
3. Zugabe von *Pseudomonas aeruginosa* zu einer PR 8-haltigen Allantoisflüssigkeit führte zum Absinken des Hämagglutinationstiters.
4. In vitro wurde die Infektiosität einer PR 8-haltigen Allantoisflüssigkeit durch Streptokokken und *Pseudomonas aeruginosa* deutlich beeinflusst. Weniger stark wirksam waren Staphylokokken und *Bacterium proteus*.
5. Lungen, die 24, 72 und 120 Std. post infectionem gewonnen worden waren, wurden untersucht. Der Virusgehalt war 3 Tage nach der Infektion am größten. Die Infektiosität blieb in den Lungen, die 24 Std. p.i. entnommen worden waren, am längsten erhalten.
6. In der Gewebesuspension ging die Infektiosität des Virus eher verloren als in der unzerkleinerten Lunge. Im gesunden Lungengewebe, das künstlich mit Virus ver-

setzt worden war, blieb das Virus länger vermehrungsfähig als in natürlich infizierten Lungen.

7. Die Haltbarkeit des Virus war in einem isotonischen Phosphatpuffer mit einem pH -Wert von 6,5 größer als in einem solchen mit einem pH von 8,0. Zusätze unterschiedlich vorbehandelter Mäuselungenextrakte zu den beiden Puffersystemen verkürzten die Nachweisbarkeitsdauer des Virus in verschieden starkem Ausmaß.

Summary

The influence of tissue disintegration on the demonstrability of viruses, studied in a special experiment with influenza virus and the pulmonary tissue of mice

H. Timm

The influence of tissue disintegration on the demonstrability of viruses was studied with the PR 8 virus and the pulmonary tissue of mice.

1. The processing of the test substance under constant cooling promoted the adsorption of virus at the cell membranes. Heating of the tissue suspension to 37°C prior to centrifugation decreased the virus loss.
2. In the lungs of mice infected by inhalation (obtained 48 hours after infection, and partly infected with staphylococci or streptococci), the virus remained demonstrable up to the 3rd day after the beginning of the experiment at incubator temperature; at $22-23^{\circ}\text{C}$ the stability fluctuated between 14–21 days, depending on the bacterial admixture, and at 9°C between 42 and 76 days. Stored at -20°C , the virus remained propagative past the 200th day.
3. The addition of *Pseudomonas aeruginosa* to allantois fluid containing PR 8 led to a fall in the hemagglutination titer.
4. In vitro, the infectiousness of PR 8-containing allantois fluid showed a marked influence of streptococci and *Pseudomonas aeruginosa*. The effect of staphylococci and *Bacterium proteus* was less marked.
5. Lungs obtained 24, 72, and 120 hours after infection were examined. Three days after the infection the virus content reached a maximum. The lungs removed 24 hours p.i. showed the longest period of infectiousness.
6. The tissue suspension lost its infectiousness earlier than the whole lung. In healthy lung tissue artificially infected by viruses, the propagative period of the virus was longer than in the lung infected in a natural manner.
7. The stability of the virus was higher in an isotonic phosphate buffer of a pH -value of 6.5 than in an isotonic phosphate buffer of a pH -value of 8.0. The addition of lung extracts of mice which had undergone varying pretreatment to both buffer systems decreased the period of demonstrability of the virus to a varying degree.

Résumé

L'influence de la destruction tissulaire sur la mise en évidence des virus; étude spéciale avec le virus de la grippe et le tissu pulmonaire de souris

H. Timm

L'influence de la destruction tissulaire sur la mise en évidence des virus a été examinée sur le virus PR 8 et sur le tissu pulmonaire de la souris.

1. La préparation du matériel expérimental sous hypothermie permanente favorisa l'adsorption du virus par les membranes cellulaires. Le réchauffement de la suspension tissulaire à 37°C avant la centrifugation diminua la perte en virus.
2. Les poumons de souris infectés par inhalation qui avaient été préparés 48 heures après l'infection et auxquels on avait ajouté en partie des staphylocoques ou des streptocoques, conservaient des virus jusqu'au troisième jour de l'expérience à la température de la couveuse; à $22-23^{\circ}\text{C}$ la stabilité variait suivant la nature des bactéries ajoutées entre 14–21 jours et à 9°C entre 42 et 76 jours. Conservé à une température de -20°C le virus gardait la faculté de se reproduire au-delà du 200^e jour.
3. L'addition de *pseudomonas aeruginosa* à un liquide allantoïdien contenant du PR 8 provoqua une diminution du titre des hémagglutinines.

EINFLUSS CHEMISCHER UND PHYSIKALISCHER FAKTOREN AUF
DIE INFEKTIOSITÄT VON VIREN, SPEZIELL VON INFLUENZAVIREN

(Schrifttum zur Veröffentlichung "Einfluss des Gewebszerfalls auf die Nachweisbarkeit von Viren; speziell experimentiert am Influenzavirus und am Mäuselungengewebe")

Zbl. Bakt. I Orig. (im Druck)

HORST TIMM

Für die in der Arbeit beschriebenen Untersuchungen wurden Mäuse als Wirtstiere gewählt. Über den Verlauf der Virusvermehrung in der Mäuselunge und die sichtbaren pathologischen Veränderungen am Gewebe liegen folgende Untersuchungsergebnisse vor.

Untersuchungen von TAYLOR im Jahr 1941 (68), die mit PR 8-Virus an Mäusen durchgeführt wurden, zeigten, dass nach intranasaler Virusbeimpfung ein schneller Virusanstieg in den Lungen erfolgte. War die verabreichte Virusdosis gross, so wurde ein maximaler Titer bereits innerhalb der ersten 24 Std. erlangt. Bei kleineren Gaben des infektiösen Materials war der proportionale Virusanstieg in den ersten 24 Std. zwar grösser, aber der höchste Titer wurde nicht vor 48 Std. erreicht. Grobe pathologische Veränderungen an den Lungen wurden in allen Fällen erst nach Erreichen des Maximaltiters beobachtet.

Ähnliche Ergebnisse werden von BELIAN (4) und v. MAGNUS (47) mitgeteilt. Nach v. MAGNUS bleibt der Virusgehalt der Lunge nach intranasaler Beimpfung von mäuseadaptierten Stämmen etwa 5 - 6 Std. lang ziemlich konstant. Daran schliesst sich eine Periode rascher Viruszunahme an. Die höchsten Titer werden 24 - 48 Std. nach der Infektion in Abhängigkeit von der verimpften Virusdosis erreicht. Dieser Titer bleibt nun bis zum 6. Tag hoch, um danach abzufallen. Dies ist wahrscheinlich auf die einsetzende Antikörperbildung zurückzuführen. Infiziert man die Versuchstiere mit einer Letaldosis, so sind die endgültig erreichten Titerhöhen unabhängig von der verabfolgten Virusmenge.

Wie bereits erwähnt, werden die Gewebsläsionen in jedem Falle erst nach Erreichen des Maximaltiters sichtbar. Tötet man die Versuchstiere

am 4. bis 5. Krankheitstag, so findet man als Ausdruck einer hämorrhagischen Entzündung die Lungenlappen ganz oder teilweise homogen rot gefärbt. Dabei können sie erheblich vergrößert, gelegentlich aber auch eingesunken sein. Histologisch erscheinen die Alveolarwände verdickt und sehr blutreich. Ein erhebliches Ödem und eine zellige Infiltration können vorhanden sein, doch werden die maximal erweiterten Alveolen nie so stark mit Exsudat angefüllt, wie z. B. bei einer Pneumokokkenpneumonie (5).

Über Fermentzusammensetzung, über Autolyse, Heterolyse und Fäulnis des Lungengewebes ist kaum etwas bekannt. Untersuchungen an einem Gewebestreifen, der im frischen Zustand einen pH-Wert von 7,2-7,4 hatte, zeigten, dass sich während der Autolyse die Azidität auf Werte von 6,0-6,5 verschob. Diese Wasserstoff-Ionenkonzentration blieb auch bei längerer Versuchsdauer auf diesem Niveau. Die Säuerung war im wesentlichen darauf zurückzuführen, dass während der Autolyse reichlich Milchsäure und Phosphorsäure gebildet wurden.

Eine weitere Zunahme der Wasserstoff-Ionenkonzentration wurde durch die Pufferwirkung der Proteine und der entstehenden Abbauprodukte verhindert. Wurde die Hauptmenge der Eigenproteine entfernt, so nahm die Wasserstoff-Ionenkonzentration zu. Gab man gleichzeitig Kasein hinzu, so zeigte sich: Die Organe aller Tiere, aber auch Hefen, Bakterien und Pflanzen haben 3 Optima für den Substratabbau: bei pH 3,2 bis 4,0; bei pH 5,2 bis 5,6 und bei pH 7,3-7,5 (72).

Die Tatsache, dass totes Gewebe seine normale Wasserstoff-Ionenkonzentration von 7,25 sehr schnell zum Säuren hin auf Werte zwischen pH 6,0 und 6,5 ändert, wird auch von anderen Autoren bestätigt (15, 44, 52). Dabei fördern im allgemeinen Säuren, die Eiweiss nicht präzipitieren, die Autolyse.

Durch neutralisierende oder alkalisierende Substanzen wird die Autolyse dagegen gehemmt oder verhindert (15). Es ist bekannt, dass sich in einer grossen Zahl von Geweben Proteinasen finden. Im sauren Bereich wird das Kathepsin wirksam (pH-Optimum 5,0), im alkalischen Bereich die Trypsase (pH-Optimum 8,0). Der autolytische Prozess wird durch das Wirksamwerden von Kathepsin eingeleitet (saurer Bereich). Da es nach dem Tode innerhalb der Zelle zu Lösungen von Haftpunkten kommt, wodurch SH-Gruppen frei werden, die das Kathepsin aktivieren, wird dieses Enzym zu Beginn des Gewebszerfalls, also unter optimalen Bedingungen, wirksam werden können. Wahrscheinlich vermag es auch die Nukleoproteide des Zellkerns anzugreifen, indem es die Eiweisskomponente abspaltet und die Nukleine so dem Abbau durch Polynukleidasen zugänglich macht (44).

Wie verhalten sich die Viren im allgemeinen und die Influenzaviren im besonderen gegenüber den verschiedensten physikalischen und chemischen Einflüssen? Zur Beantwortung sind jene Beobachtungen von besonderem Interesse, die an Viren im Gewebsverband oder im Gewebestreifen gemacht wurden.

So konnte SMORODINTSEFF in Mäuselungengewebe, das bei 37°C autolytisch wurde, bereits nach 2 Tagen kein infektiöses Grippevirus mehr nachweisen (64e), während andere Forscher feststellten, dass die löslichen Virusantigene zu dieser Zeit noch intakt waren (64d).

SCHERP, FLOSDORF und SHAW (61) untersuchten u. a. Lungen von Mäusen, die der experimentellen Grippekrankheit erlegen waren. Verwendet wurde das Schweine-Influenzavirus Stamm S15. Im Gewebsverband blieb die Pathogenität des Virus bis zu 2 Wochen erhalten, wenn das Material im gefrorenen Zustand bei -10°C oder in Glycerin bei Temperaturen zwischen 0°C und

4°C gelagert wurde. Wurde aus den infizierten Lungen mit physiologischer Kochsalzlösung ein Extrakt hergestellt oder wurden Suspensionen des Gewebes zubereitet, dann war die Haltbarkeit schlecht.

Bessere Ergebnisse wurden dagegen nach Gefriertrocknung der Lungen erzielt. Bei Lagerung im Kühlschrank war noch nach 6 Monaten eine hohe Pathogenität erhalten. Bei Zimmertemperatur waren auch hier die Ergebnisse wesentlich schlechter. Wurden Virusextrakte oder Suspensionen kranker Lungen gefriergetrocknet, so war der grösste Teil der Pathogenität bereits unmittelbar nach dem Trocknen verlorengegangen. Wurde das so vorbehandelte Material bei 0° bis 4°C aufbewahrt, dann war das Virus bereits nach 1 Woche nicht mehr infektiös.

HORSFALL (32) konnte das Influenzavirus in einer Suspension infizierter Mäuselungen, die am 4. Tag p.i. gewonnen wurden, bei einer Aufbewahrungstemperatur von -80°C noch nach 5 Monaten nachweisen, ohne dass sich der Infektiositätstiter während dieser Zeit wesentlich verändert hatte. Lag die Aufbewahrungstemperatur dagegen bei 37°C, fand sich schon nach 30 Min. ein deutlicher Titerabfall.

Für niedrige Temperaturen erhielt TURNER (70) praktisch die gleichen Ergebnisse. Bei -78°C eingefroren, konnten die Influenzaviren (vornehmlich PR 8) aus einer Mäuselungen-Suspension noch nach 6 Monaten ohne wesentlichen Titerverlust nachgewiesen werden.

Über das Verhalten einiger anderer Viren im toten Gewebe wurde folgendes bekannt. IONESCU (35) beobachtete, dass das Tollwutvirus im Hirngewebe, das bei 18°C im Dunkeln autolysiert wurde, in manchen Fällen 4 Monate lang virulent blieb. Die Zellen wurden vollkommen zerstört, die Negri'schen Körperchen aber blieben erhalten. In dem bei 37°C aufbewahrten Hirngewebe blieb die Virulenz des Virus Fixe bei einem pH von 7,1 bis zum 9. Tag erhalten. Nach dieser Zeit war der Zellträger völlig autolysiert, während die Negri'schen Körperchen - wenn nun auch avirulent - histologisch nachweisbar blieben.

WALDMANN (74) berichtete, dass das Virus der MKS in Aphthenresten im Sommer 21, im Herbst 49 und im Winter 103 Tage lang infektiös blieb. Auch die Pockenviren behielten im eingetrockneten Schorf ihre Infektiosität recht lange (Solomkin, 64 g).

WEYER (76) erwähnte als Kuriosum eine Isolierung von Psittakose-Erregern, die bei einem Wellensittich nach 37tägigem Erdgrab im Winter gelang. Dazu muss jedoch bemerkt werden, dass die Miyagawanellen einen eigenen Fermentstoffwechsel haben und dadurch vielleicht widerstandsfähiger als echte Viren sind (38).

Nach Untersuchungen von HEGYELI (64c) war das Schweinepestvirus im Milzgewebe schon 60 Std. nach dem Tode nicht mehr infektiös. Im Blut und Dünger ging die Infektiosität nach 40 Std., im Gartenboden nach 4-12 Tagen verloren.

Auch das Herpesvirus verlor im Gewebe, das bei Laboratoriumstemperatur zerfiel, schon am 4. Tage einen beträchtlichen Teil seiner Infektiosität (64).

GURWITSCH und Mitarb. (64b) beobachteten, dass das Virus der Pferdeencephalitis im Dünger - also in einer faulenden Umgebung - seine Infektiosität im Sommer in 15, im Winter in 30 Tagen verlor.

Mit dem Gewebserfall eng verknüpft ist die Frage nach dem Einfluss von Fermenten auf die Virusnachweisbarkeit.

Während F.L.HORSFALL jr. in RIVERS Lehrbuch: "Viral and Rickettsial Infections of Man" (33) über die Eigenschaften der Influenzaviren schreibt, dass sie gegenüber der Einwirkung von Enzymen widerstandsfähig sind, während auch SMORODINTSEFF und SCHISCHKINA (64f) nachwiesen, dass das vermehrungsfähige Grippevirus Gewebsenzymen gegenüber sehr widerstandsfähig ist und dass nur das denaturierte Virusprotein durch Fermente schnell abgebaut werden kann, gibt es jedoch auch zahlreiche Beobachtungen an anderen Virusarten, die einen Einfluss der Fermente auf Viren nachweisen.

So stellten v.PROWAZEK und MIYAJI (55) in Verdauungsversuchen am Vakzinevirus fest, dass es durch Pepsinsalzsäure weitgehend verändert wurde, während es durch Trypsin unbeeinflusst blieb. Später stellte HIRANO (28) jedoch fest, dass es die Salzsäure war, die das Virus schädigte, nicht das Pepsin. Durch Trypsin und Diastase konnte das Vakzinevirus nicht angedaut werden, leicht dagegen durch Lipase.

MERRILL (50) untersuchte den Einfluss von kristallisiertem Trypsin und Chymotrypsin u. a. auf Schweine-Influenzavirus. Dabei konnte gezeigt werden, dass beide Fermente das Virus nicht angriffen. Pferdeencephalitisvirus wurde dagegen durch Chymotrypsin inaktiviert, nicht durch Trypsin. Das Vakzinevirus wurde langsam durch Trypsin angegriffen, während seine Aktivität durch Chymotrypsin unbeeinflusst blieb. Das Virus der Pseudolyssa wurde von beiden Enzymen angegriffen.

Das Herpes simplex-Virus kann nach AMOS (2) durch Gewebsphosphatasen in beträchtlicher Masse inaktiviert werden. Ein Zusatz von Phosphatase-Inhibitoren oder Phosphatase-Substraten vermag die Überlebenszeit des Virus zu verlängern.

Es ist jedoch auch denkbar, dass die während des Gewebserfalls entstehenden Abbauprodukte einen Virusnachweis verhindern können. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung von RUBINI, RASMUSSEN und STAHMANN (60), dass basische, synthetische Lysinpolypeptide das Viruswachstum im Hühnerei hemmten. Die Vermutung lag nahe, dass sich diese Peptide mit dem Virus verbanden und es so dem Nachweis entzogen.

EATON und Mitarb. (49a) beobachteten, dass die basischen Aminosäuren Arginin, Lysin und Ornithin das Wachstum von Influenza (PR 8 und Lee)- und Mumpsviren in der Gewebekultur aufhielten. Dabei war L-Lysin etwa 2mal so aktiv wie DL-Lysin.

Wie verhalten sich Viren gegenüber den zahlreichen physikalischen Einwirkungen, wie Einfrieren und Auftauen, Temperatureinflüsse, Änderungen der Wasserstoff-Ionenkonzentration usw.? HORSFALL (32) experimentierte mit Influenzavirus-haltiger Mäuselungen-Suspension, die bei -80°C eingefroren worden war und die über einen Zeitraum von 5 Monaten beobachtet wurde. Während dieser Zeit wurde das Material 9mal aufgetaut und wieder eingefroren, ohne dass es zu einem wesentlichen Titerverlust kam.

PENTTINEN (53) schreibt, dass der Effekt wiederholten Einfrierens und Auftauens auf Influenzavirus-Vakzine gering ist. Auch TYRRELL und HORSFALL (71) konnten nach wiederholtem Einfrieren und Auftauen (das Material wurde bei -20°C eingefroren und im Wasserbad bei 37°C oder unter laufender Wasserleitung aufgetaut) nur eine geringe Verminderung der

Infektiosität und des Hämagglutinationstiters von Influenzavirus beobachten. Lediglich bei Verwendung dialysierter Allantoisflüssigkeit wurden die Infektiosität und das Hämagglutinationsvermögen verschiedener Influenzaviren (auch PR 8) nach wiederholtem Einfrieren und Auftauen zerstört.

GREIFF, BLUMENTHAL, CHIGA und PINKERTON (22) setzten PR 8-haltige Allantoisflüssigkeit 5 Einfrier- und Auftau-Zyklen aus. Dadurch kam es zu einem Titerverlust von $10^{-8,6}$ auf $10^{-0,8}$. Die grössten Verluste wurden in den Zyklen 2, 3 und 4 beobachtet. Schnelles Abkühlen auf -40°C oder langsames Abkühlen auf -80°C oder -190°C führte zu keinem wesentlichen Titerverlust. Rasches Abkühlen auf Temperaturen, die oberhalb von -40°C lagen, oder langsames Abkühlen auf Temperaturen oberhalb von -80°C hatte eine deutliche Abnahme des Titers zur Folge. Zu einem Titerverlust während einer 3wöchigen Beobachtungszeit kam es nur bei Temperaturen, die oberhalb von -40°C lagen.

In der praktischen Virusdiagnostik gilt für jedes Virusmaterial schnelles Einfrieren auf -70°C , Einhalten dieser Temperatur bis zur Weiterverarbeitung und vorsichtiges, d.h. langsames Auftauen als optimale Bedingung für die Anzucht von Viren. Schon 1maliges Auftauen und erneutes Einfrieren kann wegen der Empfindlichkeit der Viren gegenüber grösseren Temperaturschwankungen den Erregernachweis beeinflussen (KÖHLER, 26).

Die Viren unterliegen einer starken Beeinflussung durch die Temperatur, in der Regel verlieren sie zwischen 50 und 60°C die Infektiosität. Bei 56°C ist das Influenzavirus bereits nach 30 Min. vollkommen inaktiviert (59, 64). Auch Zimmertemperatur oder die Temperaturen des menschlichen Körpers werden schlecht vertragen. Unter diesen Umständen bleibt das Virus höchstens wochen-, meistens aber nur tagelang am Leben. Nur getrocknete Viren (64) sind der Wärme gegenüber widerstandsfähiger. Die Infektiosität von Influenzavirus geht bei Zimmertemperatur bereits nach wenigen Stunden verloren (23). Auch die Kühlschranktemperatur bietet nur etwas bessere Bedingungen, so bleibt das Influenzavirus bei 4°C nach KIKUTH (23) 1 Woche lang infektiös.

BIELING und HEINLEIN (6) berichten, dass sich das Grippevirus bei 4°C bis 6°C in der Allantoisflüssigkeit wochenlang hält. Weniger widerstandsfähig ist es dagegen in einer Mäuselungenaufschwemmung. In der unzerkleinerten Mäuselunge ist es mit einem Glyzerinzusatz im Kühlschrank recht lange haltbar (5, 6).

Nach PENTTINEN (53) bleibt der Hämagglutinationstiter von gereinigtem Influenzavirus bei 4°C 2 Monate lang unverändert. Temperaturen unter dem Gefrierpunkt, besonders aber Temperaturen um -70°C , werden vom Influenzavirus - wie überhaupt von den Viren - sehr gut vertragen. Nach Reinigung und Anreicherung durch Adsorption an Aluminiumhydroxyd wird das Influenzavirus gegenüber schädlichen physikalischen Einflüssen erheblich widerstandsfähiger (5).

Es sei noch erwähnt, dass die Wärme-Inaktivierungskurve der Viren dem Ablauf erstklassiger Reaktionen folgt, d.h. während gleicher Zeitspannen gehen stets gleiche Teile der Viren zugrunde (64).

Neben der Aufbewahrungstemperatur spielt die Wasserstoff-Ionenkonzentration des umgebenden Milieus für die Virusnachweisbarkeit eine grosse Rolle. Nahezu alle Virusarten haben das pH-Optimum

für ihre Haltbarkeit im Bereich um den Neutralpunkt. In der Regel wird eine Verschiebung des Milieus zur alkalischen Seite hin besser vertragen als zur sauren (11a, 23, 26, 59 u.a.).

Im Jahre 1937 beobachteten ANDREWES und SMITH (3) während der Vorversuche zur Reinigung von Influenzavirus (WS-Stamm), dass die Infektiosität zwischen pH 7-9 recht gut haltbar war; dagegen blieb sie im sauren Bereich nicht sehr lange erhalten.

Die grösste Haltbarkeit der Infektiosität von PR 8-Virus wurde von STOCK und FRANCIS (66) bei einem pH-Wert von 7 beschrieben. Sie führten ihre Untersuchungen mit Zitrat- (pH 3,0 - 5,3), Phosphat- (pH 6,0 - 8,0) und Glyzin-Puffer (pH 9,0 - 11,2) bei einer Aufbewahrungstemperatur um 28°C durch. Lag der pH-Wert der Puffer-Virusmischungen unter 5 oder über 10, so wurde das Virus innerhalb 1 Std. oder eines noch kürzeren Zeitraumes inaktiviert. Bei pH 7 blieb es dagegen wenigstens 72 Std. infektiös.

Ausgehend von diesen Erkenntnissen untersuchte MILLER (51) im Jahre 1944 den Einfluss des pH-Wertes auf Infektiosität und Hämagglutination der Stämme PR 8 und Lee sowie der Schweine-Influenzaviren. In Phosphatpuffer war die Infektiosität von PR 8-Virus am stabilsten bei einem pH-Wert zwischen 6,5 und 7, die des Schweine-Influenzavirus zwischen 7 und 7,9 und die des Lee-Stammes bei einem pH von 7,9 oder höher.

Die Hämagglutinationsfähigkeit von PR 8 in Phosphatpuffer war bei pH 7 am stabilsten, die des Schweine-Influenzavirus zwischen 7 und 8 und die des Lee-Stammes bei einem pH-Wert, der über 9 lag.

Ausserdem wurde beobachtet, dass die verschiedenen Influenzavirus-Stämme ihre Infektiosität und Agglutinationsaktivität auf der sauren Seite von ihrem optimalen pH-Wert viel schneller verloren als auf der alkalischen Seite. Unter bestimmten Bedingungen der Pufferung und Wasserstoff-Ionenkonzentration ging die Infektiosität stets eher verloren als die Hämagglutinationsfähigkeit. In einem zusammengesetzten Phosphat-Glyzin-Kochsalz-Puffer zeigten die untersuchten Viren eine grössere Stabilität ihrer Eigenschaften als bei Aufbewahrung in einem Phosphatpuffer gleicher Konzentration allein. Auch die Unterschiede für den optimalen pH-Bereich waren weniger deutlich. Alle 3 Virusarten zeigten maximale Haltbarkeit ihrer Eigenschaften bei einem pH zwischen 7 und 8 mit Ausnahme des PR 8-Virus, dessen Infektiosität bei pH 7 stabiler zu sein schien als bei pH 8.

LAUFFER, CARNELLY und MacDONALD (42) untersuchten den Einfluss höherer Temperaturen bei unterschiedlicher Wasserstoff-Ionenkonzentration auf die Infektiosität des Influenzavirus A. Bei 46°C und einem pH von 8,5 bzw. bei 54°C und einem pH von 7,5 ging die Infektiosität während einer 10minütigen Aufbewahrung nur langsam verloren.

Die Autoren schlossen daraus, dass die Infektiosität ihre grösste Stabilität bei pH-Werten zwischen 7,5 und 8,5 besitzt. Auch die Hämagglutinationsaktivität hatte in einem ähnlichen pH-Bereich ihre grösste Haltbarkeit.

Einen Überblick über die Widerstandsfähigkeit von Influenzavirus A und zahlreichen anderen Virusarten verschiedenen Wasserstoff-Ionenkonzentrationen gegenüber gaben GONNERT u. BOCK (21). Sie verwendeten für ihre Untersuchungen eine von TEORELL u. STENHAGEN angegebene Pufferlösung, mit der im Bereich von pH 2,0 - 12,0 gearbeitet werden konnte. Die Viren wurden jeweils 1 Std. dem zu untersuchenden Milieu ausgesetzt und vor der Weiterverimpfung auf Versuchstiere auf den Neutralpunkt eingestellt.

Die Versuche ergaben, dass alle geprüften Virusarten durch pH-Werte zwischen 5 und 9 nicht nennenswert beeinflusst wurden. Bei pH 4 - 5 zeigten neurotrope Viren ein vorübergehendes Absinken des Titers, da ihr IEP in diesem Bereich lag. Während die geprüften Viren im stark sauren Bereich bei pH 2 inaktiviert wurden, erwiesen sie sich auf der alkalischen Seite als auffallend widerstandsfähig. Noch bei einem pH-Wert von 11 konnte lebendes Virus nach 1 Std. nachgewiesen werden.

TISCHER (69) untersuchte die pH-Abhängigkeit der Hämagglutination am PR8-Virus. Phosphat-gepufferte Virus-Suspensionen zeigten einen um so höheren Titer, je weiter sich die Wasserstoff-Ionenkonzentration zum alkalischen Bereich hin verschob, wobei die höchsten Werte um pH 10 gefunden wurden. Oberhalb von pH 10,5 sank die Agglutinationsaktivität wieder ab. TISCHER nahm nun an, dass sich im alkalischen Bereich ein Inhibitor vom Virus trennte. Bei einem pH von 5,5 - 5,7 wurde der Inhibitor am stärksten gehemmt, unterhalb von pH 5,5 wurde er sehr schnell unwirksam.

Auch osmotische Veränderungen könnten zu einem Verlust der Pathogenität führen. Nach Beobachtungen von TYRRELL u. HORSFALL (71) blieb das Influenzavirus durch hohe NaCl-Konzentrationen und plötzliche extreme Veränderungen im osmotischen Druck (sog. Osmotischer Schock), die Bakteriophagenteilchen zerstörten, unbeeinflusst.

Jede Grippeerkrankung kann mit bakteriellen Sekundärinfektionen einhergehen oder beginnt mit einer Mischinfektion vor allem mit hämolytischen Streptokokken, Staphylokokken, Influenzabakterien, Pneumokokken, seltener Coryne- und Friedländer-Bakterien und *Micrococcus catarrhalis* (23, 27).

Es ist weiterhin bekannt, dass man virushaltiges Gewebe in Glyzerin aufbewahrt, um das Bakterienwachstum einzuschränken. Unter diesen Bedingungen gehen die nicht-sporenbildenden Keime zugrunde.

Können Viren durch Bakterien direkt beeinflusst werden? Vom Tabakmosaikvirus weiss man (GOLDIN, 64a), dass es von Saprophyten nicht geschädigt wird. Es kann sogar an die Oberfläche von Bakterien adsorbiert werden und dabei erhalten bleiben.

KATZENBERGER und KÜHLWEIN (37) untersuchten den Einfluss von Myxobakterien, die sich durch eine lytische Aktivität auszeichnen, auf Influenzaviren A und B und Mumpsviren. In allen Fällen wurde der Virusgehalt der untersuchten Allantoisflüssigkeiten durch *Myxococcus virescens* stark herabgesetzt.

In Ergänzung zu den soeben geschilderten Faktoren, die das Influenzavirus im Verlaufe des Gewebszerfalls möglicherweise schädigen können, ist noch das Verhalten von Grippeviren und einigen anderen Virusarten unter verschiedenen Umwelteinflüssen zu schildern:

In der Luft suspendiert, bleibt das Influenzavirus (PR8) wenigstens 30 Min. nachweisbar und für Frettchen infektiös (WELLS und BROWN, 75). Trocknet das Virus an Gegenständen oder Hausstaub an, so findet man nach 3 Tagen nur einen geringen Verlust an vermehrungsfähigem Virus (EDWARD, 14). Nach etwa 1 Woche kann man noch 10% aktiven Virus und nach 14 Tagen noch 1% nachweisen. Die Überlebensrate wird aber durch

langsames Trocknen in einer feuchten Atmosphäre, bei höheren Temperaturen (37°C) und bei Lichteinwirkung sehr viel kleiner. Ausserhalb des Körpers kann das Grippevirus u.U. also recht lange erhalten bleiben. So kann Schweine-Influenzavirus, das sich in den Lungenwürmern erkrankter Tiere findet, dort lange überleben. Noch nach 1 Monat vermag es, wenn man die Würmer verfüttert, zur Erkrankung der Schweine zu führen (SHOPE, 63).

Die Erreger der Pocken erwiesen sich als besonders widerstandsfähig gegenüber Austrocknung. In trockenen Blatternkrusten, die bei Zimmertemperatur aufbewahrt wurden, waren die Viren noch nach 1 Jahr infektiös (59).

Bei einer Temperatur von -20°C blieb das Herpes simplex-Virus in infizierten Chorioallantoismembranen, die entweder unzerkleinert in Glycerin oder zermahlen in einem Magermilchmedium aufgehoben wurden, 4 Monate lang ohne Titerverlust erhalten. Eine deutliche Titerabnahme fand sich während dieser Zeit bei 4°C, doch konnte sie durch Magermilch- oder Dotter-Zusatz verringert werden (ALLEN, KANEDA, GIRARDI, McNAIR SCOTT und SIGEL, 1).

Eine umfassende Zusammenstellung der Eigenschaften des Polio-myelitisvirus gaben SCHUBLADSE und GAIDAMOWITSCH (62). Bei 56°C wird es nach 30 Min. vollständig inaktiviert. Bei 37°C ist es nach 24 Std. nicht mehr lebensfähig. Bei Zimmertemperatur (18-24°C) wird es erst nach vielen Tagen inaktiviert, zuweilen bleibt es sogar 3-4 Monate am Leben. In Milch, Sahne und Trinkwasser ist das Virus bei Zimmertemperatur wochenlang haltbar. Bei 2°C bleibt es in Fäkalien und Kanalisationswasser einige Monate lang vermehrungsfähig. Bei 4°C bleibt seine Lebensfähigkeit mehrere Monate lang erhalten, in 50%igem Glycerin sogar 6-8 Jahre. Gegenüber Magensaft und Galle, Aceton, Äther und Antibiotica ist es resistent. Die optimale Wasserstoff-Ionenkonzentration liegt im neutralen und schwach sauren Bereich. Seine Widerstandskraft Chloreinwirkung gegenüber ist gross, jedoch wird es im Wasser bei pH 6,8 bis 7,4 durch freies Chlor (0,1 - 0,2%) völlig inaktiviert.

Nach Untersuchungen von KÖHLER (40, 41) behält das in vivo von Granulozyten phagozytierte Poliomyelitisvirus seine Antigenität über Wochen. Bis zu etwa 4 Wochen bleibt es vermehrungsfähig.

Abschliessend soll über die Haltbarkeit der Viren in Abhängigkeit von der Präparation des Sektionsgewebes berichtet werden.

BELIAN (4) fasst die für die Grippevirus-Diagnostik nötigen Voraussetzungen in folgendem Satz zusammen: "Die Anzüchtbarkeit von Grippevirus-Stämmen ist heute eine reine Frage der Schnelligkeit. Es kommt auf die sofortige Benachrichtigung durch die Klinik, die rasche Beurteilung des Sektionsbefundes und die ständige Bereitschaft des Virus-Forschungs-Institutes an."

Sobald bei der Sektion der Verdacht auf eine Grippeerkrankung entsteht, sollte das zu untersuchende Gewebe möglichst ohne sekundäre Verunreinigungen entnommen und in ein steriles Aufbewahrungsgefäss gebracht werden. Wenn irgend möglich sollte das Gewebe schnell auf -70°C abgekühlt und in einem Thermosgefäss dem nächsten virologischen Untersuchungsamt zugesandt werden.

Dort wird das Gewebe langsam aufgetaut, zerkleinert und in einer Verdünnungsflüssigkeit aufgeschwemmt. Diese Suspension wird nun, da man es ja mit unbekannten, an das Hühnerei nicht adaptierten Virusstämmen zu tun

hat, in die Amnionhöhle 13 Tage alter Hühnerembryonen injiziert (4, 26, 39, 43, 45, 46 u.a.). Neben einer ständigen Bereitschaft ist also auch ein erheblicher Materialaufwand für die Virus-Isolierung aus Gewebe notwendig.

LITERATUR

1. Allen, E.G., Kaneda, B., Girardi, A.J., McNair Scott, T.F., and Sigel, M.M.: Preservation of Viruses of the Psittacosis-Lymphogranuloma Venerum Group and Herpes Simplex under Various Conditions of Storage. - J.Bact. 63, 369 (1952)
2. Amos, H.: The Inactivation of Herpes Simplex Virus by Phosphatase Enzymes. - J.exp. Med. 98, 365 (1953)
3. Andrewes, C.H., and Smith, W.: Influenza: Further Experiments on the Active Immunization of Mice. - Brit. J. exp. Path. 18, 43 (1937)
4. Belian, W.: Virusgrippe (nach einem Vortrag auf der Epidemiologen-Tagung in Dresden vom 29.9. bis 1.10.1954) Sonderdruck aus Z. ges. Hyg. Heft 2 (1955)
5. Bieling, R.: Viruskrankheiten (I. Teil: Die Viruskrankheiten des Menschen.) - J.A. Barth-Verlag, Leipzig, (1954)
6. Bieling, R. und Heinlein, H.: Die Grippe, Ergebnisse experimenteller Untersuchungen. - Johann Ambrosius Barth-Verlag, Leipzig (1949)
7. Bieling, R. und Oelrichs, L.: Untersuchungen über die Hämagglutination durch Grippevirus. - Z. Hyg. 127, 535 (1948)
8. Bieling, R. und Oelrichs, L.: Untersuchungen über die Hemmungswirkung von Organzellen und Extrakten sowie von Allantoisflüssigkeit auf die hämagglutinierende Wirkung des Grippevirus. - Z. Hyg. 127, 545 (1948)
9. Burnet, F.M.: Hemagglutination in Relation to Host Cell-Virus Interaction. - Ann. Rev. Microbiol. 6, 229 (1952)
10. Burnet, F.M.: Recent Work on the Intrinsic Qualities of Influenza Virus. - Bull. Org. mond. Santé 8, 661 (1953)
11. Burnet, F.M., and STANLEY, W.M.: The Viruses (Biochemical, Biological, and Biophysical Properties). - 11a) Volume 1, General Virology 11b) Volume 3, Animal Viruses - Academic Press, New York - London (1959)
12. Davenport, F.M., and Horsfall, F.L.: The Association Reactions of Pneumonia Virus of Mice (PVM) and Influenza Viruses; the Effects of pH and Electrolytes upon Virus-Host Cell Combinations. - J. exp. Med. 88, 621 (1948)

13. Diagnostic Procedures for Virus and Rickettsial Diseases. - Amer. Publ. Health Ass., New York City, 2nd Edition, 1956
14. Edward, D.G.: Resistance of Influenza Virus to Drying and its Demonstration on Dust. - Lancet 241, 664 (1941)
15. Ehrich, W.E.: Die Entzündung (S. 75 u. 150) in: Büchner, F., Letterer, E., Roulet, F.: Handbuch der allgemeinen Pathologie, VII/1, Springer-Verlag, Berlin - Göttingen - Heidelberg, 1956
16. Franklin, R.M.: The Significance of Lipids in Animal Viruses. An Essay on Virus Multiplication, in Berger, E. u. Melnick, J.L.: Progr. med. Virol. Vol. 4, S. Karger, Basel - New York, 1962, 1
17. Frisch-Niggemeyer, W.: The Internal Structure of Influenza-Virus. - Z. Naturforsch. 14b, 168 (1959)
18. Frisch-Niggemeyer, W., and Hoyle, L.: The Nucleic Acid and Carbohydrate Content of Influenza Virus A and of Virus Fractions Produced by Ether Disintegration. - J. Hyg. 54, 201 (1956)
19. Frommhagen, L.H., Freeman, N.K., and Knight, C.A.: The Lipid Constituents of Influenza Virus, Chick Allantoic Membrane, and Sedimentable Allantoic Protein. - Virology 5, 173 (1958)
20. Ginsberg, H.S., and Horsfall, F.L.: A Labile Component of Normal Serum which combines with Various Viruses. Neutralization of Infectivity and Inhibition of Hemagglutination by the Component. - J. exp. Med. 90, 475 (1949)
21. Gönnert, R. und Bock, M.: Zur Resistenz von Viren. - Z. Hyg. 141, 60 (1950)
22. Greiff, D., Blumenthal, H., Chiga, M., and Pinkerton, H.: The Effects on Biological Materials of Freezing and Drying by Vacuum Sublimation. - J. exp. Med. 100, 89 (1954)
23. Grumbach, A. und Kikuth, W.: Die Infektionskrankheiten des Menschen und ihre Erreger. - Band II, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1958 - S. 1307, 1313, 1318
24. Harford, C.G., Hamlin, A., and Parker, E.: Electron Microscopy of Early Cytoplasmic Changes due to Influenza Virus. - J. exp. Med. 101, 577 (1955)
25. Hauschild, F.: Pharmakologie und Grundlagen der Toxikologie, S. 86, 181, 740 - VEB Georg Thieme, Leipzig, 1960
26. Henneberg, G. und Köhler, H.: Praktikum der Virusdiagnostik. - Gustav Fischer Verlag - Stuttgart, 1961

27. Herzberg, K. in: Gundel, M.: Die ansteckenden Krankheiten. - Georg Thieme Verlag - Stuttgart, 1950, S. 736 ff.
28. Hirano, N.: On the Attitudes of Vaccinia Virus against some Ferments. The Kitasato Archiv of Experimental Medicine 8, 394 (1931)
29. Hirst, G.K.: The Quantitative Determination of Influenza Virus and Antibodies by Means of Red Cell Agglutination. - J.exp.Med. 75, 49, (1942)
30. Hirst, G.K.: Adsorption of Influenza Virus on Cells of the Respiratory Tract. - J. exp. Med. 78, 99 (1943)
31. Hollós, I.: Electronmicroscopic Examination of Complete and Incomplete Influenza Virus Particles. - Acta microbiol. Acad. Sci. hung. IV, 4, 459 (1957)
32. Horsfall, F.L.: Neutralization of Epidemic Influenza Virus. - J. exp. Med. 70, 209 (1939)
33. Horsfall jr., F.L.: Influenza (S. 392 ff.) in: Rivers, Th.M.: Viral and Rickettsial Infections of Man. - Second Edition, J.B. Lippincott Company Philadelphia - London - Montreal, 1952
34. Horsfall F.L. and Tamm, I.: Chemotherapy of Viral and Rickettsial Diseases. - Ann. Rev. Microbiol. 11, 339 (1957)
35. Ionescu, D.: Untersuchungen über die Autolyse von Tollwutgehirnen. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 151, 21 (1943)
36. Iwasiki, K.: Studies on Influenza Virus. VI. Preservation of Antigenicity of Influenza Virus. - Kitasato Arch. exp. Med. Vol. XXVII, No. 4, 95 (1954)
37. Katzenberger, I., Kühlwein H. und Kausche, G.A.: Über den Einfluss von Myxobakterien auf Viren. - Zbl. Bakt., II. Abt. 109, 478 (1956)
38. Kikuth, W. und Hennessen, W.: Zur Laboratoriumsdiagnostik der Viruserkrankheiten. - Münch. med. Wschr. 97, 457 (1955)
39. Klöne, W.: Laboratoriumsdiagnose menschlicher Virus- und Rickettsien-Infektionen. - Springer-Verlag - Berlin - Göttingen - Heidelberg, 1953
40. Köhler, H.: Die Rolle der Leukozyten als Virusträger. - Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 180, 140 (1960)
41. Köhler, H.: Neue Wege bei der Isolierung des Poliomyelitisvirus aus dem Blut an Kinderlähmung erkrankter Menschen. - Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 180, 145 (1960)

42. Lauffer, M.A., Carnelly, H.L., and MacDonald, E.: Thermal Destruction of Influenza A Virus Infectivity. - Arch. Biochem. 16, 321 (1948)
43. Lépine, P.: Méthodes de laboratoire appliquées à l'étude du virus grip-pal. - Bull. Org. mond. Santé 8, 683 (1953)
44. Letterer, E.: Allgemeine Pathologie. - Georg Thieme Verlag - Stutt-gart, 1959, S. 151 ff.
45. Lippelt, H. und Brand, G.: Zur Isolierung von Influenza-Virusstäm-men. - Dtsch. med. Wschr. 79, 165 (1954)
46. Lippelt, H. und Hinz, W.: Epidemiologische Feststellungen zur Influenza-Epidemie 1952 (Isolierung eines Influenzavirus). - Dtsch. med. Wschr. 77, 2, 958 (1952)
47. von Magnus, P.: The Influenza Virus: its Morphology, Immunology, and Kinetics of Multiplication. - Bull. Org. mond. Santé 8, 647 (1953)
48. Marcuse, K. und Beeke, G.-M.: Über das Verhalten menschlicher Erythrozyten beim Hirst-Test auf Influenzavirus. - Arch. ges. Virusforsch. 4, 659 (1952)
49. Matthews, R.E.F., and Smith, J.D.: The Chemotherapy of Viruses. - Adv. Virus Res. Vol. III, S. 49, Acad. Press Inc., Publishers New York 10, N.Y. (1955)
49a) Eaton, M.D., Maganasik, B., Perry, M.E., and Karibian, D.: zit. nach Matthews, R.E.F., and Smith, J.D.
50. Merrill, M.H.: Effect of Purified Enzymes on Viruses and Gram-negative Bacteria. - J. exp. Med. 64, 19 (1936)
51. Miller, G.L.: Influence of pH and of Certain other Conditions on the Stability of the Infectivity and Red Cell Agglutinating Activity of Influenza Virus. - J. exp. Med. 80, 507 (1944)
52. Müller, E.: Der Zelltod, in: Büchner, F., Letterer, E. und Roulet, F.: Handbuch der allgemeinen Pathologie II/1, Springer-Verlag, Berlin - Göttingen - Heidelberg (1955)
53. Penttinen, K.: The Effect of Low Temperatures on Vaccines of Influenza Virus and on Purified Influenza Virus. - J. Immunol. 64, 165 (1950)
54. Pigarevski, V.E.: Cellular Factors in the Defence of the Host in Influenza. - Acta Virologica (English Edition) 1, 30 (1957)
55. von Prowazek, S. und Miyaji, S.: Weitere Untersuchungen über das Vaccine-Virus. - Zbl. Bakt. 75, 144 (1915)

56. Pye, J., Holden, H.F., and Donald, H.B.: Sedimentation Behaviour and Electron Microscopic Examination of Purified Influenza Virus. - J.gen.Microbiol.14, 634 (1956)
57. Rauen, H.M.: Biochemisches Taschenbuch, S.650 - Springer-Verlag, Berlin - Göttingen - Heidelberg, 1956
58. Reed, C.J., and Muench, H.: Simple Method for the Estimation of Fifty per Cent End Points. - Amer.J.Hyg.27, 493 (1938)
59. Rhodes, A.J., and van Rooyen, C.E.: Textbook of Virology. - Third Edition. - Baltimore, The Williams and Wilkins Company, 1958, S.29 ff.
60. Rubini, J.R., Rasmussen, A.F., and Stahmann, M.A.: Inhibitory Effect of Synthetic Lysine Polypeptides on Growth of Influenza Virus in Embryonated Eggs. - Proc.Soc.exp.Biol.76, 662 (1951)
61. Scherp, H.W., Flosdorf, E.W., and Shaw, D.R.: Survival of the Influenza Virus under Various Conditions. - J.Immunol.34, 447 (1938)
62. Schubladse, A.K.und Gaidamowitsch, S.J.: МЕДУИЗ, МОСКВА 1948
63. Shope, R.E.: An Intermediate Host for the Swine Influenza Virus. - Science 89, 441 (1939)
64. Sinkovics, J.: Die Grundlagen der Virusforschung. - Verlag der Ungarischen Akademie der Wissenschaften, 1956.
zit.nach Sinkovics, J.:
 - a) Goldin, M.I.
 - b) Gurwitsch - Brin - Budarenko - Ladeina
 - c) Hegyeli, Z.
 - d) Jeremjew, G.W., Orlowa, N.N.
 - e) Smorodintseff
 - f) Smorodintseff, A.A., Schischkina, O.I.
 - g) Solomkin
65. Sokolov, M.I., Kulikova, K.S., Kholeva, S.I., and Azadova, N.B.: Factors Contributing to the Preservation of the Viability of Influenza Virus on Desiccation and Prolonged Storage. - Problems of Virology 3, (4), 262 (1958)
66. Stock, C.Ch., and Francis jr., Th.: The Inactivation of the Virus of Epidemic Influenza by Soaps. - J.exp.Med.71, 661 (1940)
67. Tamm, I.: Influenza Virus - Erythrocyte Interaction. II. Effect of Egg Passage on the Reactions between a Recently Recovered Influenza A Virus and Sheep Erythrocytes. - J.Immunol.73, 190 (1954)

68. Taylor, R.M.: Experimental Infection with Influenza A Virus in Mice. J.exp.Med.73, 43 (1941)
69. Tischer, I.: Versuch zur Hämagglutination durch Influenza-Virus. - 2.Mitt.: Die pH-Abhängigkeit der Hämagglutination. - Z.Naturforsch. 14b, 763 (1959)
70. Turner, T.B.: The Preservation of Virulent Treponema Pallidum and Treponema Pertenué in the Frozen State; with a Note on the Preservation of Filtrable Viruses. - J.exp.Med.67, 61 (1938)
71. Tyrrell, D.A.J., and Horsfall, F.L.: Disruption of Influenza Virus (Properties of Degradation Products of the Virus Particle). - J.exp.Med.99, 321 (1954)
72. Utkin-Ljubowzow, L.und Steppuhn, O.: Methodik des Studiums autolytischer Prozesse, in: Abderhalden, E.: Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Abt.IV, Teil 2, 855 (1936)
73. Voss, H.und Wengel, E.: Formen des Grippevirus. - Zbl.Bakt.,I.Abt. Orig.162, 225 (1955)
74. Waldmann: L'état des recherches sur la fièvre aphteuse dans les Laboratoires de Recherches de l'État de l'île de Riems (Le rôle prophylactique du sérum hyperimmunisant contre la fièvre aphteuse). - Bull.Office Intern.Epizootics 1, 518 (1928)
75. Wells, W.F., and Brown, H.W.: Recovery of Influenza Virus Suspended in Air and its Destruction by Ultraviolet Radiation. - Amer.J.Hyg. 24, 407 (1936)
76. Weyer, F.: Zur Lage der Psittakose und Ornithose in Deutschland. - Münch.med.Wschr.101, 851 (1959)
77. Wildy, P.and Horne, R.W.: Structure of Animal Virus Particles. - in Berger, E.und Mulnick, J.L.: Progr.med.Virol., Vol.5, S. Karger, Basel - New York, 1963, 1

Dr. Horst Timm

Robert Koch-Institut
1 Berlin 65
Nordufer 20

Lebenslauf

Am 16. November 1937 wurde ich als Sohn des Friseurs Leo Timm und seiner Ehefrau Gerda, geb. Lankau, in Berlin-Neukölln geboren.

Im Jahre 1943 wurde ich in Kreuzburg/Oberschlesien eingeschult. Wegen der Kriegsunruhen siedelten wir 1944 nach Hohenlubbichow/Neumark über. Schon ein Jahr später zwang uns die näherrückende Front zur Flucht nach Berlin, wo ich seit September 1945 die 14. Grundschule für Knaben besuchte.

Nach Abschluß der 4. Volksschulklasse besuchte ich die 1. Oberschule für Knaben in Berlin-Neukölln seit September 1947. An dieser Schule legte ich im März 1956 die Reifeprüfung ab.

Auf eigenen Wunsch und mit Zustimmung meiner Eltern entschied ich mich für ein Medizinstudium. Seit dem Sommersemester 1956 studierte ich an der Freien Universität Berlin Medizin. Nach fünf vorklinischen Semestern bestand ich am 31. Oktober 1958 die ärztliche Vorprüfung mit der Note „sehr gut“. Im November 1962 legte ich die ärztliche Prüfung mit dem Urteil „gut“ ab.

